



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

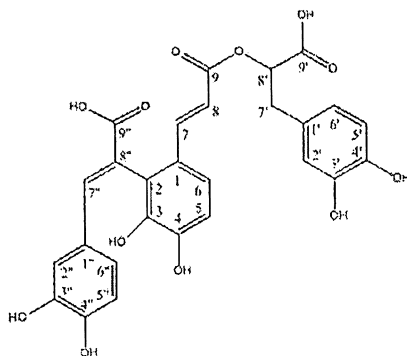
(11) 
1-0022881

(51)⁷ **C07C 69/732, 67/48, A61P 17/18, C07C 67/31, A61K 31/216, A61P 9/00**

-
- (21) 1-2016-00729 (22) 26.08.2014
(86) PCT/CN2014/085154 26.08.2014 (87) WO2015/027891 05.03.2015
(30) 201310384234.6 29.08.2013 CN
(45) 27.01.2020 382 (43) 25.08.2016 341
(73) **TASLY PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (CN)**
Tasly Modern TCM Garden, Pu Jihe East Road No.2, Beichen District, Tianjin
300410, China
(72) **ZHOU, Shuiping (CN), LI, Wei (CN), JIN, Yuanpeng (CN), LI, Xinxin (CN), MA, Xiaohui (CN), ZHOU, Wei (CN), HAN, Min (CN), LI, Shuming (CN)**
(74) **Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)**
-

(54) **AXIT SALVIANOLIC T, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến axit salvianolic có công thức (I), phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất axit này để điều trị bệnh và cũng đề cập đến các chất chống oxy hóa, chất khử gốc tự do chứa hợp chất này.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y dược, cụ thể là đề cập đến hợp chất axit salvianolic, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất axit này.

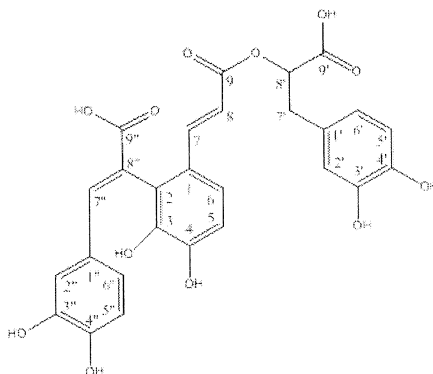
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đan sâm (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) là rễ của cây thuộc chi *Salvia*, họ hoa môi (*Labiatae*, còn được gọi là họ bạc hà), có vị đắng và hơi lạnh, có tác dụng sinh lý lên tim và gan với chức năng ngăn chặn cơn đau bằng cách loại bỏ sự tắc nghẽn, kích thích lưu thông máu và làm giảm chứng hồi hộp bằng cách thông máu cho tim. Các nghiên cứu dược lý hiện đại đã chỉ ra rằng, đan sâm có tác dụng làm giãn mạch vành, cải thiện tuần hoàn vi mạch, có khả năng ức chế và loại bỏ sự kết tụ tiểu cầu, làm tăng khả năng chịu đựng của cơ thể đối với sự thiếu hụt oxy, tăng khả năng chống viêm gan, chống khối u và virus. Năm 2001, Viện Dược liệu, Viện Khoa học Y tế Trung Quốc & trường Cao đẳng Y tế liên hiệp Bắc Kinh đã báo cáo rằng có 13 hợp chất axit phenolic trong thành phần hoạt tính hòa tan trong nước của đan sâm và các cây cùng chi, bao gồm axit salvianolic A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, axit lithospermic, axit rosmarinci, và axit isosalvianolic C (theo Lianniang Li và cộng sự, *Bulletin of Medical Research*, 2001, Vol. 30(7)), và hoạt tính dược lý của 13 hợp chất axit phenolic này cũng được làm rõ. Năm 2002, Rena Kasimu và cộng sự đã báo cáo về cấu trúc hóa học của axit salvianolic K (Rena Kasimu và cộng sự, *Journal of Xinjiang Medical University*, 2002, Vol. 25(3)). Các nhà nghiên cứu ngoại quốc cũng đã nghiên cứu về thành phần hoạt tính hòa tan trong nước của đan sâm. Năm 1999, Đại học George Washington đã nộp đơn và sau đó được cấp bằng sáng chế ở Mỹ đối với 13 hợp chất có cấu trúc hóa học khác nhau của axit salvianolic, có tác dụng kháng enzym integrase của virus HIV và các virus khác, điều đó gợi ý rằng đan sâm là nguồn cây thuốc có tiềm năng lớn và có giá trị đang được phát triển.

Axit salvianolic T theo sáng chế là hợp chất mới được tìm thấy trong đan sâm nhờ quá trình sàng lọc quy mô lớn. Cho đến nay, cấu trúc và tác dụng dược lý có liên quan đến axit salvianolic T vẫn chưa được báo cáo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất axit salvianolic T có công thức (I), muối được dụng và solvat của nó:



Công thức (I)

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế axit salvianolic T.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm, chất chống oxy hóa, chất khử gốc tự do, chứa axit salvianolic T.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit salvianolic T để bào chế thuốc điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính và bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit salvianolic T để bào chế thuốc điều trị bệnh xơ phổi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit salvianolic T để bào chế dược phẩm chống oxy hóa.

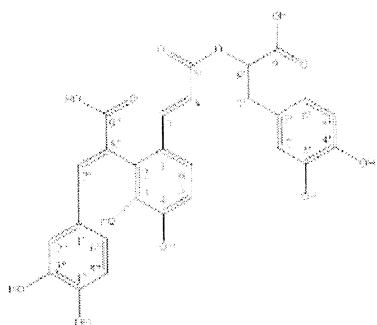
Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit salvianolic T để điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính, bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính hoặc bệnh xơ phổi.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit salvianolic để trì hoãn quá trình lão suy.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa axit salvianolic để chống oxy hóa.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến các đối tượng được nêu ở các mục từ [1] đến [37] sau đây:

[1] Axit salvianolic T được thể hiện bằng công thức (I), muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng (chiral isomer) và solvat của nó:



Công thức (I)

[2] Phương pháp điều chế axit salvianolic T được đề cập ở mục [1], trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(1a) Chiết xuất: chiết xuất dược phẩm đan sâm ở dạng thô (*Radix Salvia miltiorrhiza*) hoặc hỗn hợp của đan sâm và các dược phẩm ở dạng thô khác bằng nước, cô đặc dịch lọc để thu được sản phẩm chiết trong nước, sau đó bổ sung rượu để kết tủa và thu được lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, cô đặc lớp chất lỏng nổi trên bề mặt để thu được sản phẩm chiết trong rượu;

(1b) Phân tách: pha loãng sản phẩm chiết trong rượu thu được ở bước (1a) bằng nước, rót hỗn hợp lên nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn, rửa nhựa bằng dung dịch nước axit để loại bỏ tạp chất và tiếp đó rửa giải nhựa bằng etanol để thu được sản phẩm rửa giải trong etanol, cô đặc sản phẩm rửa giải trong etanol để thu được chất chiết;

Hoặc, thay thế các bước (1a) và (1b) bằng bước (1) sau:

(1) Tổng hợp: hòa tan axit salvianolic B trong nước, sau đó gia nhiệt dung dịch thu được;

(2) Tinh chế: điều chỉnh pH của dịch phản ứng thu được trong bước (1) đến pH axit; hoặc tinh chế dịch chiết thu được trong bước (1b) bằng sắc kí lỏng có áp suất cao (HPLC) điều chế, với cột silica gel pha đảo C18 làm cột sắc kí, hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic là chất rửa giải, thực hiện rửa giải đẳng dung môi (isocratic elution) hoặc rửa giải gradient (gradient elution), với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu gom sản phẩm rửa giải chứa axit salvianolic T; cô đặc để thu được axit salvianolic T.

[3] Phương pháp điều chế chất đồng phân bất đối xứng (chiral) của axit salvianolic T được đề cập ở mục [1], trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(1a) Chiết xuất: chiết xuất dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và các dược phẩm ở dạng thô khác bằng nước, cô đặc dịch lọc để thu được sản phẩm chiết trong nước, tiếp đó bổ sung rượu để kết tủa và thu gom lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, cô đặc lớp chất lỏng nổi trên bề mặt để thu được sản phẩm chiết trong rượu;

(1b) Phân tách: pha loãng sản phẩm chiết trong rượu thu được ở bước (1a) bằng nước, rót hỗn hợp lên nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn, rửa nhựa bằng dung dịch nước axit để loại bỏ tạp chất và tiếp đó rửa giải nhựa bằng etanol để thu được sản phẩm rửa giải trong etanol, cô đặc sản phẩm rửa giải trong etanol để thu được sản phẩm chiết;

Hoặc, thay thế các bước (1a) và (1b) bằng bước (1) như sau:

(1) Tổng hợp: hòa tan axit salvianolic B trong nước, sau đó gia nhiệt cho dung dịch thu được;

(2) Tinh chế: điều chỉnh pH của dịch phản ứng thu được trong bước (1) đến pH axit; hoặc tinh chế dịch chiết thu được ở bước (1b) bằng HPLC điều chế, với cột silica gel pha đảo C18 làm cột sắc kí, hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic làm chất rửa giải, thực hiện rửa giải đẳng dung môi, với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu gom sản phẩm rửa giải chứa axit salvianolic T; cô đặc để thu được axit salvianolic T.

(3) Điều chế chất đồng phân bất đối xứng: tách chất đồng phân bất đối xứng từ axit salvianolic T thu được ở bước (2) bằng sắc kí lỏng điều chế, với cột sắc kí là cột bất

đối xứng pha đảo, chất rửa giải là hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic, thực hiện rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu gom sản phẩm rửa giải chứa axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T một cách riêng rẽ, đông khô để thu được các sản phẩm tinh khiết của axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T.

[4] Phương pháp điều chế như được mô tả ở các mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và các dược phẩm ở dạng thô khác là những mẫu thuốc sắc, vụn nghiền hoặc bột, dược phẩm ở dạng thô khác là tam thất (*Radix Notoginseng*) hoặc hoàng kỳ (*Radix Astragali*) hoặc tổ hợp của hai loại này mà tương thích với đan sâm.

[5] Phương pháp điều chế như được mô tả ở các mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), bước chiết xuất trong nước được thực hiện như sau: sắc dược phẩm ở dạng thô với nước theo tỉ lệ khối lượng nước gấp 4 - 8 lần khối lượng dược phẩm ở dạng thô trong 1,5 - 4 giờ; lọc; cô đặc dịch lọc để thu được dịch chiết trong nước với tỉ trọng tương đối là 1,10 - 1,30 (ở 80°C).

[6] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), bước chiết xuất trong nước được thực hiện như sau: sắc dược phẩm ở dạng thô với nước theo tỉ lệ khối lượng nước gấp 6 lần khối lượng dược phẩm ở dạng thô trong 3 giờ; lọc; cô đặc dịch lọc để thu được dịch chiết trong nước với tỉ trọng tương đối là 1,22 (ở 80°C).

[7] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), dung dịch nước kiềm được sử dụng trong bước chiết xuất bằng nước, kiềm nói trên ít nhất được chọn từ nhóm bao gồm: dung dịch natri bicacbonat, dung dịch nước natri cacbonat, dung dịch kali hydro cacbonat, dung dịch kali cacbonat, dung dịch nước natri hydroxit, dung dịch nước kali hydroxit.

[8] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [7], trong đó dung dịch nước kiềm là dung dịch nước natri bicacbonat với nồng độ 0,3 - 0,45% (trọng lượng/thể tích).

[9] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), việc kết tủa bằng rượu được thực hiện như sau: bổ sung etanol 95% (thể tích/thể tích) vào dịch chiết trong nước để tiến hành kết tủa cho đến khi nồng độ etanol đạt 50% - 70% (thể tích/thể tích) (ở 25°C), rồi hỗn hợp được để yên trong 8 - 36 giờ; thu lấy phần lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, thu hồi etanol dưới áp suất thấp, cô đặc để thu nhận dịch chiết trong rượu với tỷ trọng tương đối 1,25 - 1,5 (ở 60°C).

[10] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), việc kết tủa bằng rượu được thực hiện như sau: bổ sung etanol 95% (thể tích/thể tích) vào dịch chiết trong nước để tiến hành kết tủa cho đến khi nồng độ etanol đạt 60% (thể tích/thể tích) (ở 25°C), hỗn hợp được để yên trong 24 giờ; thu lấy phần lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, thu hồi etanol dưới áp suất thấp, cô đặc để thu nhận dịch chiết trong rượu với tỷ trọng tương đối 1,32 (ở 60°C).

[11] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1b), nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là loại nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn không phân cực hoặc phân cực yếu.

[12] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [11], trong đó nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn không phân cực hoặc phân cực yếu là loại AB - 8, HPD450, D101, hoặc X5.

[13] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [12], trong đó nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn không phân cực hoặc phân cực yếu là loại AB - 8.

[14] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1a), tỷ lệ khối lượng của dược phẩm ở dạng thô so với nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là 5:1 - 1:1.

[15] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [14], trong đó ở bước (1a), tỷ lệ khối lượng của dược phẩm ở dạng thô so với nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là 3:1.

[16] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1b), dung dịch nước axit ít nhất là một loại dược chọn từ nhóm bao gồm: dung dịch nước axit clohydric, dung dịch nước axit sunfuric, dung dịch nước axit nitric và dung dịch nước axit axetic hoặc tổ hợp của chúng; pH của dung dịch được điều chỉnh nằm trong khoảng

1,0 - 5,0; rửa bằng dung dịch nước axit cho đến khi sản phẩm rửa giải là gần như không màu.

[17] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [16], trong đó dung dịch nước axit là dung dịch nước axit clohydric; pH của dung dịch được điều chỉnh về 3,0.

[18] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1b), etanol 50% - 95% (thể tích/thể tích) được sử dụng để rửa cột 4 - 10 lần; sản phẩm rửa giải được cô đặc để thu được sản phẩm chiết không có mùi rượu.

[19] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [18], trong đó etanol 50% - 95% (thể tích/thể tích) được sử dụng để rửa cột 5 lần

[20] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1), nguyên liệu ban đầu dùng cho phản ứng là axit salvianolic B hoặc muối của nó.

[21] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1), tỷ lệ khối lượng của axit salvianolic B và dung dịch nước là 1:0,1 - 1:100000, nhiệt độ phản ứng là 10 - 150°C, thời gian phản ứng là 10 phút đến 24 giờ.

[22] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1), tỷ lệ khối lượng của axit salvianolic B và dung dịch nước là 1:200, nhiệt độ phản ứng là 90°C, thời gian phản ứng là 1 giờ.

[23] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1), dung dịch nước là dung dịch nước axit, dung dịch nước trung tính hoặc dung dịch nước kiềm.

[24] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (1), dung dịch nước là dung dịch nước kiềm, dung dịch nước kiềm ít nhất là một loại được chọn từ nhóm bao gồm: dung dịch natri bicacbonat, dung dịch nước natri cacbonat, dung dịch kali hydro cacbonat, dung dịch kali cacbonat, dung dịch nước natri hydroxit và dung dịch nước kali hydroxit.

[25] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [8], trong đó dung dịch nước kiềm là dung dịch natri bicacbonat với nồng độ 0,05% - 0,45% (w/v).

[26] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (2), dung dịch bất kì trong số dung dịch nước axit clohydric, dung dịch nước axit sunfuric, dung dịch nước của axit nitric và dung dịch nước axit axetic hoặc tổ hợp của chúng đều có thể được sử dụng để điều chỉnh độ pH của dung dịch phản ứng về 1,0 - 6,0.

[27] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [26], trong đó dung dịch nước axit clohydric được sử dụng để điều chỉnh dung dịch phản ứng về pH 3,0.

[28] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [2] hoặc [3], trong đó ở bước (2), HPLC có thể là HPLC trực động (dynamic axial HPLC), cột sắc kí là cột silica gel pha đảo C18, hòa tan dịch phản ứng đã được điều chỉnh pH trong bước 1 hoặc dịch chiết thu được trong bước 1(b) với pha di động, pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 10:90:1 - 90:10:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; HPLC được sử dụng để giám sát quá trình rửa giải, thu gom phân đoạn trong khoảng thời gian 21,2 - 24 phút, cô đặc để sấy khô, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

[29] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [28], trong đó pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 10:90:1 - 50:50:1.

[30] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [28], trong đó pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1.

[31] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [28], trong đó quá trình rửa giải sử dụng pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1 để thực hiện rửa giải đẳng dung môi.

[32] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [3], trong đó ở bước (3), sắc kí lỏng điều chế đã được sử dụng để thực hiện phân tách đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo, hòa tan axit salvianolic T thu được ở bước (2) với pha di động, pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỷ lệ thể tích là 10:90:1 - 90:10:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient; tốc độ dòng là 25 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; HPLC được

sử dụng để giám sát quá trình rửa giải, thu gom phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T với thời gian lưu giữ 19,5-21,1 phút và thu gom phân đoạn axit (*R*) - salvianolic T với thời gian lưu giữ 23,59 - 25,3 phút một cách riêng rẽ, đông khô sau khi cô đặc ở nhiệt độ thấp, thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

[33] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [32], trong đó pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỷ lệ thể tích là 17:83:1.

[34] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [32], trong đó quá trình rửa giải sử dụng pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỷ lệ thể tích là 17:83:1 để thực hiện quá trình rửa giải đẳng dung môi.

[35] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [32], trong đó nhiệt độ thấp là 10 - 40°C.

[36] Phương pháp điều chế như được mô tả ở mục [32], trong đó nhiệt độ thấp là 30°C.

[37] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1].

[38] Chất chống oxy hóa chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1].

[39] Chất khử gốc tự do chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1].

[40] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng trong bào chế thuốc để điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính và thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính.

[41] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng trong bào chế thuốc điều trị bệnh xơ phổi.

[42] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối dược dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng trong bào chế chất chống oxy hóa.

[43] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối dược dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng để điều trị nhồi máu cơ tim cấp tính, thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính hoặc bệnh xơ phổi.

[44] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối dược dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng để làm chậm quá trình lão hóa.

[45] Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối dược dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả ở mục [1] được sử dụng để chống oxy hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình minh họa ảnh phổ khối độ phân giải cao của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.2 là hình minh họa phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H (^1H NMR) của axit salvianolic T ở 500 MHz, bằng việc sử dụng dimethyl sulfoxide (DMSO - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.3 là hình minh họa phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C (^{13}C NMR) của axit salvianolic T ở 125 MHz, bằng việc sử dụng DMSO, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.4 là hình minh họa phổ tăng cường không biến dạng bằng chuyển phân cực (DEPT - Detortionless enhancement by polarization transfer) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.5 là hình minh họa phổ tương quan (COSY - Correlation spectroscopy) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.6 là hình minh họa phổ tác dụng Overhauser hạt nhân khung quay (ROESY - Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.7 là hình minh họa phổ tương quan lượng tử đơn dị hạt nhân (HSQC - Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.8 là hình minh họa phổ tương quan liên kết đa dị hạt nhân (HMBC - Heteronuclear multiple bond correlation) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.9 là hình minh họa phổ lưỡng sắc vòng tròn (CD - Circular dichroism) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

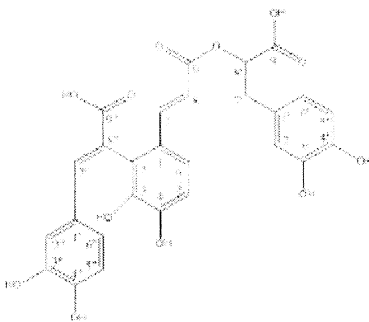
Fig.10 là hình minh họa sự so sánh giữa phổ CD và phổ lưỡng sắc vòng tròn điện tử (ECD - Electronic circular dichroism) của axit salvianolic T, A: axit (*R*) - salvianolic T; B: axit (*S*) - salvianolic T.

Fig.11 là hình minh họa sinh thiết tim của từng nhóm trong nghiên cứu về tác dụng của axit (*R*) - salvianolic T đối với chứng nhồi máu cơ tim cấp tính.

Fig.12 là hình minh họa tác dụng ức chế của axit (*R*) - salvianolic T và axit (*S*) - salvianolic T đối với sự tăng sinh tế bào L929 gây ra bởi nhân tố tăng trưởng chuyển hóa beta 1 (TGF - β 1).

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất axit salvianolic T có công thức cấu tạo (I), muối được dụng, đồng phân bất đối xứng và solvat.



Công thức cấu tạo (I)

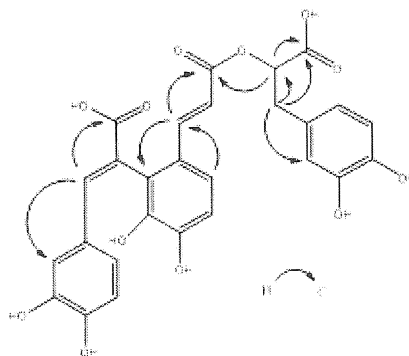
Theo sáng chế, cấu trúc hợp chất mới của axit phenolic đã được xác định bởi tính chất lí hóa, khối phổ độ phân giải cao (QFT - ESI), khối phổ ion hóa tia điện (ESI - MS), ^1H - NMR, ^{13}C - NMR, DEPT, COSY, HMBC, HMQC và CD (Fig.1 - Fig.10).

^1H - NMR (phổ hydro) cho thấy 1 tín hiệu của proton methenyl được gắn với oxy ở δ 4,93(1H, dd, 8,0, 4,5 Hz); 11 tín hiệu proton thơm ở δ 6,85 (1H, d, 8,5 Hz), δ 7,31 (1H, d, 8,5 Hz), δ 7,41 (1H, d, 15,5 Hz), δ 6,27 (1H, d, 15,5 Hz), δ 6,62 (1H, s), δ 6,63 (1H, d, 8,0 Hz), δ 6,47 (1H, d, 8,0 Hz), δ 6,44 (1H, d, 2,0 Hz), δ 6,55 (1H, d, 8,5 Hz), δ 6,43 (1H, dd, 8,5, 2,0 Hz), δ 7,69 (1H, s); 2 tín hiệu của proton béo tại δ 2,89 (2H, ddd, 14,0, 8,0, 4,5 Hz).

^{13}C - NMR (phổ cacbon) cho thấy 27 tín hiệu cacbon, bao gồm 1 tín hiệu cacbon béo ở δ 36,0, 1 tín hiệu cacbon methenyl được liên kết với oxy ở δ 72,8, 3 tín hiệu cacbon carbonyl ở δ 166,0, δ 170,6, δ 168,4, và 22 tín hiệu cacbon liên kết đôi ở δ 123,7, δ 126,4, δ 142,9, δ 147,7, δ 115,0, δ 118,4, δ 143,7, δ 113,9, δ 127,1, δ 116,5, δ 143,9, δ 144,8, δ 115,5, δ 120,0, δ 126,0, δ 117,3, δ 144,8, δ 147,2, δ 115,3, δ 122,9, δ 141,1, δ 123,4.

Độ quay cụ thể của 2 đồng phân của hợp chất theo sáng chế tương ứng là - 157,5° và 196,6°. Cấu trúc phân tử của hợp chất có cấu hình tuyệt đối C - 8' được xác định khi cấu hình *S/R* tương ứng được tối ưu, tiếp đó phương pháp BPV86 có TD - SCF (Time - dependent self - consistent field) được sử dụng để tính toán tại bộ cơ sở 6 - 31++G (2d, p), kết quả tính toán được đọc và so sánh với phổ CD của hợp chất theo sáng chế, kết quả cuối cùng cho thấy rằng kết quả tính toán các hợp chất của 2 cấu hình cơ bản chồng khớp với phổ CD thử nghiệm của hợp chất theo sáng chế, tóm lại cấu hình tuyệt đối C -

8' của 2 đồng phân của hợp chất theo sáng chế tương ứng là cấu hình *S* và cấu hình *R* (xem Fig.10). Mối tương quan HMBC của hợp chất theo sáng chế như sau:



Hợp chất theo sáng chế là hợp chất axit salvianolic mới, chất mà được gọi là axit salvianolic T.

Do những thay đổi về cấu hình và hình thể xảy ra đối với hợp chất theo sáng chế trong quá trình chiết, nên theo đó, sự thay đổi có thể xảy ra đối với dữ liệu phổ hợp chất trên. Nhưng các loại đồng phân khác nhau được tạo ra bởi sự thay đổi cấu hình và hình thể vẫn thuộc phạm vi của sáng chế.

Theo kiến thức kỹ thuật chung và kỹ thuật trước đây, axit salvianolic T theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo thành muối được dụng hoặc solvat của nó. Muối được dụng của axit salvianolic T theo sáng chế bao gồm các muối được dụng thông thường được sản xuất từ nguyên liệu vô cơ hoặc hữu cơ vốn được sản xuất nhờ phương pháp tạo muối thông thường. Ví dụ thích hợp cho các muối này bao gồm muối natri, muối kali, muối liti, muối magie, muối nhôm, muối canxi, muối kẽm, hoặc các muối được tạo thành nhờ phản ứng với N,N' - dibenzyl etylendiamin, chlorprocaine, colin, dietanolamin, etylendiamin, N - metyl glucoseimin, procaine và berberin. Axit salvianolic T được mô tả dưới đây gồm axit salvianolic T có công thức (I) và muối được dụng, đồng phân bất đối xứng và solvat.

Axit salvianolic T theo sáng chế được sử dụng một cách thích hợp dưới dạng thành phần dược phẩm, thành phần này thông thường có thể được sử dụng bằng cách trộn với một hoặc nhiều loại chất mang được dụng hoặc tá dược. Nếu có thể, axit salvianolic T theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc trong điều trị, tốt nhất là thành phần hoạt tính được lựa chọn sẽ được sử dụng trực tiếp dưới dạng dược phẩm. Xét từ khía cạnh về

sự tương thích với các thành phần khác và sự an toàn cho bệnh nhân, chất mang phải là chất mang được dụng.

Theo đó, sáng chế đề xuất dược phẩm của axit salvianolic T, dược phẩm bao gồm axit salvianolic T theo sáng chế và một hay nhiều loại chất mang được dụng, và có hoặc không có các thành phần trị liệu và/hoặc phòng ngừa khác. Dược phẩm có thể được sử dụng qua đường uống, đường tiêm (bao gồm tiêm dưới da như tiêm hoặc thuốc viên dạng bể chứa, tiêm trong da, tiêm nội tủy sống, tiêm bắp dưới dạng bể chứa và tiêm tĩnh mạch), đường trực tràng và tại chỗ (cụ thể như ngâm dưới lưỡi). Tuy nhiên, việc sử dụng còn tùy thuộc vào bệnh nhân. Dược phẩm trên có thể là dạng liều đơn, và có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kì được biết đến trong lĩnh vực dược phẩm. Tất cả các phương pháp đều bao gồm bước kết hợp axit salvianolic T theo sáng chế với chất mang cấu thành một hay nhiều loại thành phần tá dược. Nói chung, dược phẩm theo sáng chế được sản xuất như sau: trộn và làm đồng nhất axit salvianolic T theo sáng chế với chất lỏng, hoặc chất mang rắn được nghiền mịn, hoặc hỗn hợp của cả hai loại trên, tiếp đó, nếu cần thiết tạo sản phẩm thành dược phẩm mong muốn.

Thông thường, một loạt các công nghệ dược phẩm tiêu chuẩn có thể được sử dụng để sản xuất dược phẩm theo sáng chế bằng việc sử dụng axit salvianolic T và chất mang được dụng. Các công nghệ bao gồm trộn, nghiền và ép. Đặc điểm và hình thức của chất mang được dụng hoặc chất pha loãng phụ thuộc vào lượng hỗn hợp các thành phần hoạt tính, con đường sử dụng và các yếu tố liên quan khác.

Trong bản mô tả này, chất mang được dụng là tất cả các loại chất mang hữu cơ hoặc vô cơ mà có thể được sử dụng cùng với thành phần hoạt tính, cụ thể như tá dược, chất bôi trơn, chất kết dính, chất làm phân tán và chất bọc ngoài được sử dụng cho dược phẩm rắn; hoặc phụ gia dược phẩm như chất màu và chất làm ngọt. Các chất mang được dụng trên được chọn từ nhóm gồm: đường alcohol như manitol, sorbitol, xylitol; axit amin như xistein hydroclorua, methionin, glyxin; vitamin C; dinatri EDTA (Etylendiamin Tetraaxetic axit), EDTA canxi, natri pyrosunfit; các muối vô cơ như cacbonat, axetat, photphat của kim loại kiềm hóa trị 1 hoặc dung dịch nước của chúng; natri clorua, kali clorua, natri metabisunfit, natri bisunfit, natri thiosunfit; canxi cacbonat, canxi bicarbonat; muối stearat như canxi stearat, magie stearat; axit như axit clohidric, axit

sunfuric, axit photphoric, axit axetic; các muối của axit hữu cơ như natri lactat; oligosaccarit, polisaccarit, xenluloza và dẫn xuất của nó, như mantoza, glucoza, fructza, dextran, sacaroza, lactoza, xyclodextrin (như β - xyclodextrin), tinh bột; các dẫn xuất silic; alginat; gelatin; polivinylypyrrolidon; glyxerol; agar; chất hoạt động bề mặt như Tween - 80; polietylenglycol; vật liệu photpholipit; cao lạnh; bột talc...

Dạng dược phẩm có thể là dạng liều dụng bất kì, bao gồm: viên nén như viên nén bao đường, viên nén bao màng và viên nén bao tan trong ruột; viên nang như viên nang cứng và viên nang mềm; dung dịch uống; viên nén uống; dạng hạt nhỏ; dạng hạt uống sau khi hòa tan trong nước sôi; thuốc viên; thuốc dạng bột; dạng bột nhào; dạng viên; dạng huyền phù; dạng rượu; dạng tiêm; dạng đạn; dạng nhão như thuốc mỡ và hồ; dạng kem; dạng xịt; dạng nhỏ giọt và miếng dán. Tốt hơn là, dược phẩm ở dạng liều uống, cụ thể là viên nang, viên nén, dung dịch uống, dạng hạt nhỏ, dạng viên, dạng bột, và dạng bột nhào; và ở dạng liều tiêm, cụ thể là bột có thể tiêm, thuốc tiêm và thuốc tiêm truyền. Tốt nhất là dược phẩm ở dạng viên nén.

Dược phẩm dạng liều uống nói trên có thể chứa các thành phần thông dụng như tá dược, chất kết dính, chất hợp nhất, chất pha loãng, chất ép viên, chất bôi trơn, chất phân tán, chất màu, chất mùi, chất giữ ẩm, và nếu cần thiết viên nén có thể được bao ngoài.

Tốt nhất là, tá dược bao gồm lactoza, D - mannitol, D - sorbitol, tinh bột, cụ thể là tinh bột dạng α , dextrin, xenluloza tinh thể, hydroxypropyl xenluloza được thế thấp, natri cacboxymetyl xenluloza, gum arabic, amylopectin, axit silixic khan nhẹ, nhôm silicat tổng hợp hoặc magie aluminum silicat...

Tốt nhất là, chất bôi trơn bao gồm magie stearat, canxi stearat, bột talc và silica gel (gel axit silixic).

Tốt nhất là, chất kết dính bao gồm tinh bột dạng α , sacaroza, gelatin, gum arabic, methylxenluloza cacboxymetyl xenluloza, natri cacboxymetyl xenluloza, xenluloza tinh thể, đường, D - mannitol, trehaloza, dextrin, amylopectin, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl methyl xenluloza, pyrrolidon,...

Tốt nhất là, chất phân tán bao gồm lactoza, đường, tinh bột, cacboxymetyl xenluloza, canxi cacboxymetyl xenluloza, aminoalkyl natri, tinh bột cacboxymetyl natri, axit silixic khan nhẹ, hydroxypropyl xenluloza được thể thấp,...

Tốt nhất là, chất bao ngoài bao gồm hydroxypropyl metyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, etyl xenluloza, cacboxymetyl xenluloza, polivinyl alcohol,...

Tốt nhất là, chất màu bao gồm thuốc nhuộm màu tartrazine có thể ăn được hòa tan trong nước (thuốc nhuộm màu thực phẩm như thuốc nhuộm màu đỏ ăn được số 2 và số 3, thuốc nhuộm màu vàng ăn được số 4 và số 5, thuốc nhuộm màu lam ăn được số 1 và số 2); màu dạng hồ không tan trong nước (như muối nhôm của các thuốc nhuộm màu tartrazine ăn được tan trong nước đã đề cập ở trên) và thuốc nhuộm màu tự nhiên (cụ thể là β - caroten và clorophyl), v.v...

Tốt nhất là chất làm ngọt bao gồm natri saccharin, axit glyxyrrhetinic, aspartam và steviozit, v.v...

Phương pháp thông thường để sản xuất viên nén bao gồm việc kết hợp axit salvianolic T theo sáng chế với một hay nhiều tá dược được dụng, và tiếp đó được ép hoặc đóng khuôn.

Axit salvianolic T theo sáng chế có thể được sản xuất thành dược phẩm dạng lỏng để uống, cụ thể như: dịch huyền phù tan trong nước hoặc trong dầu, dung dịch, dịch nhũ tương, xi - rô, v.v... Axit salvianolic T theo sáng chế cũng có thể được bào chế thành sản phẩm khô, được pha trộn lại với nước hoặc các chất mang phù hợp trước khi sử dụng. Dược phẩm dạng lỏng có thể chứa các chất phụ gia thông thường, bao gồm: chất tạo huyền phù như xi - rô sorbitol, metylxenluloza, glucoza/xi - rô, gelatin, hydroxymetyl xenluloza, cacboxymetyl xenluloza, nhôm stearat dạng gel hoặc chất béo ăn được đã hydro hóa; chất tạo nhũ tương như lexitin, sorbitan monooleat hoặc gum arabic; chất mang không có nước (bao gồm dầu ăn được) như dầu hạnh nhân, dầu dừa phân đoạn, este butyraceous, propylen glycol hoặc etanol; chất bảo quản như metylparaben, nipasol, hoặc axit sorbic.

Dược phẩm dạng tiêm bao gồm: thuốc tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước, trong đó dược phẩm có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất diệt khuẩn, chất đẳng trương; thuốc tiêm huyền phù vô trùng chứa nước hoặc không chứa nước, trong đó dược phẩm có thể chứa chất tạo huyền phù và chất làm dày. Dược phẩm có thể được bảo quản ở dạng liều đơn hoặc liều đa như ống thuốc tiêm và lọ thuốc tiêm, và có thể được bảo quản dưới điều kiện đông khô và được hoàn tan lại với chất mang lỏng vô trùng (nước) trước khi sử dụng để tiêm.

Dược phẩm sử dụng qua đường hậu môn có thể là dạng thuốc hình viên đạn bao gồm chất nền dạng viên đạn chứa bơ cacao, axit stearic hoặc glyxerit hay etylen glycol khác.

Dược phẩm dùng để ngậm, cụ thể là ngậm ở cạnh má hoặc ngậm dưới lưỡi, bao gồm: dạng thuốc viên tròn nhỏ, trong đó thành phần hoạt tính được nhúng trong chất nền tạo mùi vị như sacaroza và gum arabic; dạng thuốc viên hình thoi, trong đó thành phần hoạt tính được nhúng trong chất nền như gelatin và glyxerol, hoặc sacaroza và gum arabic.

Axit salvianolic T theo sáng chế cũng có thể được bào chế thành dược phẩm dạng dự trữ, cụ thể là dược phẩm giải phóng lâu dài có thể được sử dụng bằng cách cấy (cấy dưới da hoặc cấy trong cơ) hoặc tiêm bắp. Do đó, axit salvianolic T theo sáng chế có thể được bào chế với chất plime phù hợp, hoặc chất kỵ nước (dạng nhũ tương trong dầu), hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc được bào chế thành dẫn xuất ít tan, cụ thể như muối ít tan.

Trong lĩnh vực kỹ thuật chung hiện nay, việc điều trị liên quan đến sáng chế bao gồm việc phòng và điều trị một số bệnh hoặc hội chứng. Bên cạnh đó, liều dùng hiệu quả của axit salvianolic T theo sáng chế phụ thuộc vào đặc điểm của bệnh và tình trạng cơ thể của bệnh nhân, hoặc theo lời khuyên của bác sĩ. Nói chung, liều dùng hiệu quả cho người lớn nằm trong khoảng 0,02 - 5000 mg/ngày, tốt nhất là 1 - 1500 mg/ngày. Liều điều trị có thể là dạng liều đơn hoặc liều đa sẽ được sử dụng bởi bệnh nhân trong khoảng thời gian thích hợp, cụ thể là, 2 lần một ngày, 3 lần một ngày, 4 lần một ngày hoặc hơn. Dược phẩm theo sáng chế bao gồm 0,1 - 99% thành phần hoạt tính, tốt nhất là 30 - 95% đối với dạng viên nén và viên nang; và tốt nhất là 3 - 50% đối với dược phẩm dạng lỏng.

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế axit salvianolic T, phương pháp bao gồm các bước sau:

(1a) Chiết xuất: chiết xuất dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và dược phẩm ở dạng thô khác với nước, cô đặc dịch lọc để thu được sản phẩm chiết trong nước, tiếp đó bổ sung rượu để kết tủa và thu lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, cô đặc lớp chất lỏng nổi trên bề mặt để thu được sản phẩm chiết trong rượu;

(1b) Phân tách: pha loãng sản phẩm chiết trong rượu của bước (1a) với nước, rót hỗn hợp lên nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn, rửa nhựa với dung dịch nước axit để loại bỏ tạp chất và tiếp đó rửa giải nhựa bằng etanol để thu được sản phẩm rửa giải trong etanol, cô đặc sản phẩm rửa giải trong etanol để thu được chất chiết;

Hoặc, thay thế các bước (1a) và (1b) bằng bước (1) sau:

(1) Tổng hợp: hòa tan axit salvianolic B trong nước, sau đó gia nhiệt dung dịch thu được;

(2) Tinh chế: điều chỉnh pH của dịch phản ứng thu được trong bước (1) đến pH axit; hoặc tinh chế dịch chiết thu được trong bước (1b) bằng HPLC điều chế, với cột silica gel pha đảo C18 làm cột sắc kí, hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic là chất rửa giải, thực hiện rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu sản phẩm rửa giải chứa axit salvianolic T; cô đặc để thu được axit salvianolic T.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chất đồng phân bất đối xứng, trong đó phương pháp bao gồm các bước sau:

(1a) Chiết xuất: chiết xuất dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và dược phẩm ở dạng thô khác với nước, cô đặc dịch lọc để thu được sản phẩm chiết trong nước, tiếp đó bổ sung rượu để kết tủa và thu lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, cô đặc lớp chất lỏng nổi trên bề mặt để thu được sản phẩm chiết trong rượu;

(1b) Phân tách: pha loãng sản phẩm chiết trong rượu của bước (1a) với nước, rót hỗn hợp lên nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn, rửa nhựa với dung dịch nước axit để loại bỏ tạp

chất và tiếp đó rửa giải nhựa bằng etanol để thu được sản phẩm rửa giải trong etanol, cô đặc sản phẩm rửa giải trong etanol để thu được chất chiết;

Hoặc, thay thế các bước (1a) và (1b) bằng bước (1) sau:

(1) Tổng hợp: hòa tan axit salvianolic B trong nước, gia nhiệt cho dung dịch thu được;

(2) Tinh chế: điều chỉnh pH của dịch phản ứng thu được trong bước (1) đến pH axit; hoặc tinh chế dịch chiết thu được trong bước (1b) bằng HPLC điều chế, với cột silica gel pha đảo C18 làm cột sắc kí, hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic là chất rửa giải, thực hiện rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu sản phẩm rửa giải chứa axit salvianolic T; cô đặc để thu được axit salvianolic T.

(3) Điều chế chất đồng phân bất đối xứng: tách chất đồng phân bất đối xứng từ axit salvianolic T thu được trong bước (2) bằng sắc kí lỏng điều chế, với cột sắc kí là cột bất đối xứng pha đảo, chất rửa giải là hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic, thực hiện rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, với bước sóng phát hiện 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu sản phẩm rửa giải chứa axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T riêng rẽ, đông khô để thu được sản phẩm tinh khiết của axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T.

Trong bước (1a), dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và dược phẩm ở dạng thô khác là những mẫu thuốc sắc, vụn nghiền hoặc bột, tốt nhất là những mẫu thuốc sắc; dược phẩm ở dạng thô khác ở đây có thể là dược phẩm ở dạng thô của Trung Quốc vốn là nơi được biết đến nhiều trong lĩnh vực đông y, dược phẩm ở dạng thô khác thích hợp nhất với đan sâm là tam thất (*Radix Notoginseng*) hoặc hoàng kỳ (*Radix Astragali*) hoặc cả hai.

Trong bước (1a), bước chiết xuất trong nước được thực hiện như sau: sắc dược phẩm ở dạng thô với nước theo tỉ lệ khối lượng nước gấp 4 - 8 lần khối lượng dược phẩm ở dạng thô trong 1,5 - 4 giờ, tốt nhất là trong 3 giờ; lọc; cô đặc dịch lọc để thu được dịch chiết với tỉ trọng tương đối là 1,10 - 1,30 (ở 80°C), tốt nhất là 1,22 (ở 80°C). Để nâng cao

hiệu quả chiết xuất và tạo muối của các hợp chất axit phenolic, dung dịch kiềm được sử dụng trong bước chiết xuất trong nước, kiềm nói trên ít nhất là một loại được chọn trong nhóm gồm: dung dịch natri bicacbonat, dung dịch natri cacbonat, dung dịch kali hydro cacbonat, dung dịch kali cacbonat, dung dịch natri hydroxit, dung dịch kali hydroxit, tốt nhất là dung dịch natri bicacbonat ở nồng độ 0,3% - 0,45% (w/v).

Trong bước (1a), bước kết tủa bằng rượu được thực hiện như sau: bổ sung ethanol 95% (thể tích/thể tích) vào dịch chiết trong nước để kết tủa cho đến khi nồng độ ethanol đạt 50% - 70% (thể tích/thể tích) (ở 25°C), tốt nhất là 60% (thể tích/thể tích), rồi hỗn hợp được để yên trong 8 - 36 giờ, tốt nhất là 24 giờ; thu phần lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, thu hồi ethanol dưới áp suất thấp, cô đặc để thu nhận dịch chiết trong rượu với tỷ trọng tương đối 1,25 - 1,5 (ở 60°C), tốt nhất là dịch chiết trong rượu có tỷ trọng tương đối 1,32 (ở 60°C).

Trong bước (1b), nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là loại nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn không phân cực hoặc phân cực yếu, có thể là loại AB - 8, HPD450, D101, hoặc X5, tốt nhất là loại AB - 8; tỷ lệ khối lượng của dược phẩm ở dạng thô với nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn trong bước (1) là 5:1 - 1:1, tốt nhất là 3:1; dung dịch axit ít nhất là một loại được lựa chọn từ nhóm gồm: dung dịch axit clohydric, dung dịch axit sunfuric, dung dịch axit nitric và dung dịch axit axetic hoặc tổ hợp của chúng, tốt nhất là dung dịch axit clohydric; pH của dung dịch được điều chỉnh vào khoảng 1,0 - 5,0, tốt nhất là 3,0; rửa bằng dung dịch axit cho đến khi sản phẩm rửa giải là gần như không màu. Sau đó, sử dụng ethanol 50% - 95% (thể tích/thể tích) để rửa cột 4 - 10 lần, tốt nhất là sử dụng ethanol 95% (thể tích/thể tích) để rửa 5 lần; sản phẩm rửa giải được cô đặc để thu được sản phẩm chiết không có mùi rượu.

Trong bước (1), nguyên liệu ban đầu cho phản ứng là axit salvianolic B hoặc muối của nó.

Trong bước (1), tỷ lệ khối lượng của axit salvianolic B và dung dịch nước là 1:0,1 - 1:100000, tốt nhất là 1:200; nhiệt độ phản ứng là 10 - 150°C, tốt nhất là 90°C; thời gian phản ứng là 10 phút đến 24 giờ, tốt nhất là 1 giờ.

Trong bước (1), dung dịch nước có thể là dung dịch nước axit, dung dịch nước trung tính hoặc dung dịch nước kiềm, tốt nhất là dung dịch nước kiềm, dung dịch nước nói trên là dung dịch nước kiềm, dung dịch nước kiềm ít nhất là một loại được chọn từ nhóm gồm: dung dịch natri bicacbonat, dung dịch natri cacbonat, dung dịch kali hydro cacbonat, dung dịch kali cacbonat, dung dịch natri hydroxit và dung dịch kali hydroxit; tốt nhất là dung dịch natri bicacbonat với nồng độ 0,05% - 0,45% (w/v).

Trong bước (2), bất kì dung dịch axit clohydric, dung dịch axit sunfuric, dung dịch axit nitric và dung dịch axit axetic hoặc tổ hợp của chúng đều có thể được sử dụng để điều chỉnh độ pH của dung dịch phản ứng về 1,0 - 6,0, tốt nhất là sử dụng dung dịch axit clohydric để điều chỉnh dung dịch phản ứng về pH 3,0.

Trong bước (2), HPLC có thể là HPLC trực động (dynamic axial HPLC), cụ thể là LC80 - 600 NOVASEP - Pháp, tốt nhất là gói sắc kí là cột silica gel pha đảo C18 (10 μ m, được cung cấp bởi công ty YMC), hòa tan dịch chiết thu được trong bước 1(b) với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 10:90:1 - 90:10:1), tốt hơn là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 10:90:1 - 50:50:1, và tốt nhất là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, tốt nhất là phương pháp rửa giải đẳng dung môi với hỗn hợp dung môi axetonitril:nước:axit formic theo tỉ lệ thể tích 15:85:1; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn trong khoảng thời gian 21,2 - 24 phút, cô đặc để sấy khô, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

Trong bước 3, hệ thống sắc kí lỏng điều chế Waters Prep 400 đã được sử dụng để thực hiện phân tách đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo CHIRALCEL® OD - RH (250 $\times$ 20 mm, 5 μ m), hòa tan mẫu axit salvianolic T thu được trong bước (2) với pha di động (axetonitril: nước: axit formic theo tỷ lệ thể tích là 10:90:1 - 90:10:1), tốt nhất là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient, tốt nhất là phương pháp rửa giải đẳng dung môi với hỗn hợp dung môi axetonitril:nước:axit formic theo tỉ lệ thể tích 15:85:1; tốc độ dòng là 25 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn axit (S)

- salvianolic T với từng khoảng thời gian lưu giữ riêng rẽ 23,59 - 25,3 phút, đông khô sau khi cô đặc ở nhiệt độ thấp (10 - 40°C, tốt nhất là 30°C), thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết .

Kết quả kiểm tra dược lực học theo sáng chế cho thấy, axit salvianolic T theo sáng chế có hoạt tính phòng ngừa chứng nhồi máu cơ tim cấp tính và thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính, có khả năng khử và làm giảm gốc tự do xuất sắc, cũng như có hoạt tính tốt trong điều trị bệnh xơ phổi.

Do đó, sáng chế đề cập đến những vấn đề sau:

Chất chống oxy hóa, chất khử gốc tự do bao gồm axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng của nó, solvat và este có thể thủy phân của nó.

Phương pháp điều chế axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được sử dụng trong bào chế thuốc để điều trị nhồi máu cơ tim cấp tính và thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được sử dụng trong bào chế thuốc điều trị bệnh xơ phổi.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được sử dụng trong bào chế chất chống oxy hóa.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được sử dụng trong điều trị nhồi máu cơ tim cấp tính, thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính hoặc bệnh xơ phổi.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được sử dụng để làm chậm quá trình lão suy.

Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối được dụng của nó, đồng phân bất đối xứng và solvat của nó được mô tả trong [1] được sử dụng để chống oxy hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế sẽ được bộc lộ rõ hơn thông qua các ví dụ điều chế và ví dụ thử nghiệm sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, phạm vi bảo hộ của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ điều chế và ví dụ thử nghiệm này.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Các mẫu thuốc sắc đan sâm được cho vào thiết bị sắc thuốc Trung Quốc, nước chứa 0,3% (w/v) natri bicacbonat được bổ sung vào với lượng gấp 6 lần đan sâm, thuốc được sắc trong 2 giờ, rồi được lọc, dịch lọc được cô đặc để thu được sản phẩm chiết trong nước với tỉ trọng tương đối là 1,22 (ở 80°C).

Etanol 95% (thể tích/thể tích) được bổ sung vào sản phẩm chiết trên cho đến khi nồng độ etanol cuối cùng là 60% (thể tích/thể tích) để kết tủa, giữ tĩnh trong 24 giờ; lớp chất lỏng nổi trên bề mặt được thu và được cô đặc dưới áp suất thấp để thu được sản phẩm chiết trong etanol với tỉ trọng tương đối là 1,37 (ở 60°C).

Sản phẩm chiết trong etanol được hòa tan trong nước, tiếp đó được rót lên cột nhựa hấp thụ có lỗ xóp lớn AB - 8, dung dịch nước axit với pH 3,0 được sử dụng để rửa cột cho đến khi sản phẩm rửa giải gần như không màu, tiếp đó, etanol 95% (thể tích/thể tích) được sử dụng với thể tích gấp 5 lần cột được sử dụng để rửa giải, sản phẩm rửa giải được cô đặc để thu được sản phẩm chiết không có mùi rượu.

Sản phẩm chiết vừa thu được được hòa tan trong pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1), HPLC trực động LC80 - 600 NOVASEP - Pháp được sử dụng để tinh chế, gói sắc kí là cột silica gel pha đảo C18 (10µm, được cung cấp bởi công ty YMC), axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1 được sử dụng để rửa giải đẳng dung môi; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn trong khoảng thời gian 21,2 - 24 phút, cô đặc để sấy khô bằng thiết bị quay hút chân không, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

Mẫu axit salvianolic T trên được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 17:83:1), sắc kí lỏng điều chế được sử dụng để phân tách đồng

phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo CHIRALCEL® OD - RH (250 × 20 mm, 5 µm), axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ 17:83:1 được sử dụng để rửa giải đẳng dung môi; tốc độ dòng là 25 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 19,5 - 21,1 phút, thu phân đoạn axit (*R*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 23,9 - 25,3 phút, cô đặc sản phẩm rửa giải bằng thiết bị quay hút chân không ở 30°C, tiếp đó đông khô để thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

Đỉnh ion bán phân tử của axit (*S*) - salvianolic T được cung cấp bởi khối phổ độ phân giải cao là $m/z = 537,1035$; đỉnh ion bán phân tử của axit (*R*) - salvianolic T là $[M - H] - m/z = 537,1034$.

Thuộc tính dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T được trình bày trên bảng sau:

Bảng 1: Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*R*) - salvianolic T (DMSO, J Hz)

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
1	-	123,7		H - 5, H - 8
2	-	126,4		H - 6, H - 7, H - 7''
3	-	142,9		H - 5
4	-	147,7		H - 5, H - 6
5	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	115,0	H - 6	
6	7,31 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	118,4	H - 5	H - 7
7	7,41 (1H, <i>d</i> , 15,5 Hz)	143,7	H - 8	H - 6
8	6,27 (1H, <i>d</i> , 15,5 Hz)	113,9	H - 7	H - 7
9	-	166,0		H - 7, H - 8, H - 8'
1'	-	127,1		H - 2', H - 5', H - 8', H - 7'

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
2'	6,62 (1H, <i>s</i>)	116,5	H - 6'	H - 6'
3'	-	143,9		H - 2', H - 5'
4'	-	144,8		H - 2', H - 5', H - 6'
5'	6,63 (1H, <i>d</i> , 8,0 Hz)	115,5	H - 6'	H - 6'
6'	6,47 (1H, <i>d</i> , 8,0 Hz)	120,0	H - 2', 5'	H - 2', H - 5'
7'	2,89 (2H, <i>ddd</i> , 14,0, 8,0, 4,5 Hz)	36,0	H - 8'	H - 2', H - 5', H - 6', H - 8'
8'	4,93 (1H, <i>dd</i> , 8,0, 4,5 Hz)	72,8	H - 7'	H - 7'
9'	-	170,6		H - 7', H - 8'
1''	-	126,0		H - 2''
2''	6,44 (1H, <i>d</i> , 2,0 Hz)	117,3	H - 6''	H - 6'', H - 7''
3''	-	144,8		H - 2'', H - 5''
4''	-	147,2		H - 2'', H - 5'', H - 6''
5''	6,55 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	115,3	H - 6''	
6''	6,43 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,0 Hz)	122,9	H - 2'', 5''	H - 2'', H - 7''
7''	7,69 (1H, <i>s</i>)	141,1		H - 6''
8''	-	123,4		H - 7''
9''	-	168,4		H - 7''

Bảng 2: Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*S*) - salvianolic T (DMSO, *J*Hz)

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
1	-	123,8		H - 5, H - 8

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
2	-	126,3		H - 6, H - 7, H - 7"
3	-	142,9		H - 5
4	-	147,7		H - 5, H - 6
5	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	115,0	H - 6	
6	7,29 (1H, <i>d</i> , 8,5 Hz)	118,4	H - 5	H - 7
7	7,41 (1H, <i>d</i> , 15,5 Hz)	143,7	H - 8	H - 6
8	6,27 (1H, <i>d</i> , 15,5 Hz)	114,0	H - 7	H - 7
9	-	165,9		H - 7, H - 8, H - 8'
1'	-	127,2		H - 2', H - 5', H - 8', H - 7'
2'	6,62 (1H, <i>s</i>)	116,5	H - 6'	H - 6', H - 7'
3'	-	143,9		H - 2', H - 5', H - 6'
4'	-	144,9		H - 2', H - 5'
5'	6,63 (1H, <i>d</i> , 8,0 Hz)	115,5	H - 6'	
6'	6,45 (1H, <i>d</i> , 8,0 Hz)	120,1	H - 2', 5'	H - 2', H - 5', H - 7'
7'	2,87 (2H, <i>ddd</i> , 14,0, 8,0, 4,0 Hz)	36,1	H - 8'	H - 2', H - 5', H - 6', H - 8'
8'	4,92 (1H, <i>dd</i> , 8,0, 4,0 Hz)	72,9	H - 7'	H - 7'
9'	-	170,6		H - 7', H - 8'
1''	-	126,0		H - 5''
2''	6,43 (1H, <i>d</i> , 2,0 Hz)	117,3	H - 6''	H - 6'', H - 7''
3''	-	144,8		H - 2'', H - 5''
4''	-	147,2		H - 2'', H - 5'', H - 6''

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
5"	6,55 (1H, <i>d</i> , 9,0 Hz)	115,3	H - 6"	
6"	6,43 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,0 Hz)	122,9	H - 2", 5"	H - 2", H - 7"
7"	7,69 (1H, <i>s</i>)	141,1		H - 2", H - 6"
8"	-	123,3		
9"	-	168,4		H - 7"

Ví dụ điều chế 2: Điều chế axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Các mẫu thuốc sắc đan sâm và tam thất được cho vào thiết bị sắc thuốc Trung Quốc, nước chứa 0,45% (w/v) natri bicacbonat được thêm vào với khối lượng gấp 4 lần tổng khối lượng các mẫu thuốc sắc đan sâm và tam thất, hỗn hợp được sắc trong 2 giờ, rồi được lọc, dịch lọc được cô đặc để thu được sản phẩm chiết trong nước với tỉ trọng tương đối 1,25 (ở 80°C).

Dung dịch etanol 95% (thể tích/thể tích) được bổ sung vào sản phẩm chiết trong nước nói trên cho đến khi nồng độ etanol cuối cùng đạt 65% (thể tích/thể tích) để thực hiện kết tủa, giữ hỗn hợp trong 12 giờ; lớp chất lỏng nổi trên bề mặt được thu rồi được cô đặc dưới điều kiện áp suất thấp để nhận được sản phẩm chiết trong etanol với tỉ trọng tương đối 1,28 (ở 60°C).

Sản phẩm chiết trong etanol tiếp đó được hòa tan với nước, rồi được rót lên cột nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn AB - 8, dung dịch nước axit với pH 2,5 được sử dụng để rửa cột cho đến khi sản phẩm rửa giải gần như không màu, tiếp đó dung dịch etanol 95% (thể tích/thể tích) được sử dụng với thể tích gấp 4 lần thể tích cột được sử dụng để rửa giải, sản phẩm rửa giải được cô đặc để thu được sản phẩm chiết không có mùi rượu.

Sản phẩm chiết vừa thu được được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1), HPLC trực động (dynamic axial HPLC) LC80 - 600 NOVASEP - Pháp được sử dụng để tinh chế, gói sắc kí là cột silica gel pha đảo C18

(10 μ m, được cung cấp bởi công ty YMC), các điều kiện sau đây được sử dụng để rửa giải gradient tuyến tính: axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích thay đổi từ 15:85:1 đến 20:80:1 từ 0 - 60 phút; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn trong khoảng thời gian 29,5 - 32,1 phút, cô đặc để sấy khô bằng thiết bị quay hút chân không, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

Mẫu axit salvianolic T được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 17:83:1), hệ thống sắc kí lỏng điều chế Waters Prep 400 đã được sử dụng để thực hiện phân tách đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo CHIRALCEL[®] OD - RH (250 $\times$ 20 mm, 5 μ m), các điều kiện sau đây được sử dụng để rửa giải gradient tuyến tính: axetonitril:nước:axit formic theo tỷ lệ thể tích thay đổi tuyến tính từ 17:83:1 đến 22:78:1 từ 0 - 45; tốc độ dòng là 20 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 25,2 - 27,1 phút, thu phân đoạn axit (*R*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 32,4 - 34,2 phút, đông khô để thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

Đỉnh ion bán phân tử của axit (*S*) - salvianolic T được cung cấp bởi khối phổ độ phân giải cao là $m/z = 537,1035$; đỉnh ion bán phân tử của axit (*R*) - salvianolic T là $[M - H] - m/z = 537,1034$.

Thuộc tính của dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T được trình bày trên bảng sau:

Bảng 3: Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*S*) - salvianolic T (DMSO, J Hz)

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
1	-	123,8		H - 5, H - 8
2	-	126,3		H - 6, H - 7, H - 7"
3	-	142,9		H - 5

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
4	-	147,7		H - 5, H - 6
5	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,5)	115,0	H - 6	
6	7,29 (1H, <i>d</i> , 8,5)	118,4	H - 5	H - 7
7	7,41 (1H, <i>d</i> , 15,5)	143,7	H - 8	H - 6
8	6,27 (1H, <i>d</i> , 15,5)	114,0	H - 7	H - 7
9	-	165,9		H - 7, H - 8, H - 8'
1'	-	127,2		H - 2', H - 5', H - 8', H - 7'
2'	6,62 (1H, <i>s</i>)	116,5	H - 6'	H - 6', H - 7'
3'	-	143,9		H - 2', H - 5', H - 6'
4'	-	144,9		H - 2', H - 5'
5'	6,63 (1H, <i>d</i> , 8,0)	115,5	H - 6'	
6'	6,45 (1H, <i>d</i> , 8,0)	120,1	H - 2', 5'	H - 2', H - 5', H - 7'
7'	2,87 (2H, <i>ddd</i> , 14,0, 8,0, 4,0)	36,1	H - 8'	H - 2', H - 5', H - 6', H - 8'
8'	4,92 (1H, <i>dd</i> , 8,0, 4,0)	72,9	H - 7'	H - 7'
9'	-	170,6		H - 7', H - 8'
1''	-	126,0		H - 5''
2''	6,43 (1H, <i>d</i> , 2,0)	117,3	H - 6''	H - 6'', H - 7''
3''	-	144,8		H - 2'', H - 5''
4''	-	147,2		H - 2'', H - 5'', H - 6''
5''	6,55 (1H, <i>d</i> , 9,0)	115,3	H - 6''	
6''	6,43 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,0)	122,9	H - 2'', 5''	H - 2'', H - 7''

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
7"	7,69 (1H, <i>s</i>)	141,1		H - 2", H - 6"
8"	-	123,3		
9"	-	168,4		H - 7"

Bảng 4: Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân của axit (*R*) - salvianolic T (DMSO, *J* Hz)

Số	δ_H	δ_C	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
1	-	123,7		H - 5, H - 8
2	-	126,4		H - 6, H - 7, H - 7"
3	-	142,9		H - 5
4	-	147,7		H - 5, H - 6
5	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,5)	115,0	H - 6	
6	7,31 (1H, <i>d</i> , 8,5)	118,4	H - 5	H - 7
7	7,41 (1H, <i>d</i> , 15,5)	143,7	H - 8	H - 6
8	6,27 (1H, <i>d</i> , 15,5)	113,9	H - 7	H - 7
9	-	166,0		H - 7, H - 8, H - 8'
1'	-	127,1		H - 2', H - 5', H - 8', H - 7'
2'	6,62 (1H, <i>s</i>)	116,5	H - 6'	H - 6'
3'	-	143,9		H - 2', H - 5'
4'	-	144,8		H - 2', H - 5', H - 6'
5'	6,63 (1H, <i>d</i> , 8,0)	115,5	H - 6'	H - 6'
6'	6,47 (1H, <i>d</i> , 8,0)	120,0	H - 2', 5'	H - 2', H - 5'

Số	δ_H	δ_c	$^1H - ^1H$ COSY	HMBC
7'	2,89 (2H, <i>ddd</i> , 14,0, 8,0, 4,5)	36,0	H - 8'	H - 2', H - 5', H - 6', H - 8'
8'	4,93 (1H, <i>dd</i> , 8,0, 4,5)	72,8	H - 7'	H - 7'
9'	-	170,6		H - 7', H - 8'
1''	-	126,0		H - 2''
2''	6,44 (1H, <i>d</i> , 2,0)	117,3	H - 6''	H - 6'', H - 7''
3''	-	144,8		H - 2'', H - 5''
4''	-	147,2		H - 2'', H - 5'', H - 6''
5''	6,55 (1H, <i>d</i> , 8,5)	115,3	H - 6''	
6''	6,43 (1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,0)	122,9	H - 2'', 5''	H - 2'', H - 7''
7''	7,69 (1H, <i>s</i>)	141,1		H - 6''
8''	-	123,4		H - 7''
9''	-	168,4		H - 7''

Ví dụ điều chế 3: Điều chế axit alvianolic T, axit (*S*) - Salvianolic T, axit (*R*) - Salvianolic T

Axit salvianolic B được lấy ra và được hòa tan trong nước chứa 0,3% (w/v) natri bicarbonat với lượng nước gấp 200 lần khối lượng axit salvianolic B, rót hỗn hợp vào bình đáy tròn, khuấy hoàn lưu trong 1 giờ ở 90°C.

Sau phản ứng, dung dịch axit clohydric 0,1 mol/l được sử dụng để điều chỉnh pH về 3,0, tiếp đó được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1), HPLC trực động LC80 - 600 NOVASEP - Pháp được sử dụng để Tinh chế, gói sắc kí là cột silica gel pha đảo C18 (10 μ m, được cung cấp bởi công ty YMC), axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ 15:85:1 được sử dụng để rửa giải đẳng dung môi; axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích thay đổi từ 15:85:1 đến 20:80:1 từ 0 - 60 phút; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa

giải bằng HPLC, thu phân đoạn trong khoảng thời gian 21,2 - 24,0 phút, cô đặc để sấy khô bằng thiết bị quay hút chân không, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

Mẫu axit salvianolic T được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 17:83:1), hệ thống sắc kí lỏng điều chế Waters Prep 400 đã được sử dụng để thực hiện phân tách đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo CHIRALCEL® OD - RH (250 × 20 mm, 5 µm), axetonitril:nước:axit formic theo tỉ lệ thể tích 17:83:1 được sử dụng để rửa giải đẳng dung môi; tốc độ dòng là 25 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 19,5 - 21,1 phút, thu phân đoạn axit (*R*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 23,9 - 25,3 phút, tiếp đó đông khô để thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

Thử nghiệm Ví dụ điều chế 4: Điều chế axit salvianolic T, axit (*S*) - Salvianolic T, axit (*R*) - Salvianolic T

Muối magie của axit salvianolic B được lấy ra và được hòa tan trong nước chứa 0,05% (w/v) natri bicacbonat với lượng nước gấp 300 lần khối lượng muối magie của axit salvianolic B, rót hỗn hợp vào bình đáy tròn, khuấy hoàn lưu trong 2 giờ ở 90°C.

Sau phản ứng, dung dịch axit clohydric 0,1 mol/l được sử dụng để điều chỉnh pH về 3,0, tiếp đó được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 15:85:1), HPLC trực động LC80 - 600 NOVASEP - Pháp được sử dụng để tinh chế, gói sắc kí là cột silica gel pha đảo C18 (10µm, được cung cấp bởi công ty YMC), các điều kiện sau đây được sử dụng để rửa giải gradient: axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích thay đổi từ 15:85:1 đến 20:80:1 từ 0 - 60 phút; tốc độ dòng là 250 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn trong khoảng thời gian 21,2 - 24,0 phút, cô đặc để sấy khô bằng thiết bị quay hút chân không, thu nhận mẫu axit salvianolic T.

Mẫu axit salvianolic T được hòa tan với pha di động (axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 17:83:1), hệ thống sắc kí lỏng điều chế Waters Prep 400 đã được sử dụng để thực hiện phân tách đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo CHIRALCEL® OD - RH (250 × 20 mm, 5 µm), các điều kiện sau đây được sử dụng để rửa giải gradient

tuyến tính: axetonitril:nước:axit formic theo tỷ lệ thể tích thay đổi từ 17:83:1 đến 22:78:1 từ 0 - 45 phút; tốc độ dòng là 20 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm. Giám sát quá trình rửa giải bằng HPLC, thu phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 25,2 - 27,1 phút, thu phân đoạn axit (*R*) - salvianolic T trong khoảng thời gian 32,4 - 34,2 phút, cô đặc sản phẩm rửa giải bằng thiết bị quay hút chân không, tiếp đó đông khô để thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

Ví dụ bào chế 1: Bào chế viên nén axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Công thức bào chế:

Axit salvianolic T, axit (<i>S</i>) - salvianolic T, axit (<i>R</i>) - salvianolic T	100 g
Xenluloza vi tinh thể (avicel)	50 g
Lactoza	30 g
Tinh bột	55 g
Natri cacboxymetyl tinh bột (CMS)	10 g
Etanol khan PVP (Polyvinylpyrrolidon) 5% (w/v)	Lượng phù hợp
Magie stearat	5 g

Công thức trên được bào chế thành 1000 viên nén

Quy trình sản xuất:

1. Tạo hạt

Axit salvianolic T, (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T và tá dược khác được liệt kê trong công thức được sàng qua rây cỡ 100 mesh (0,149 mm). Theo liều lượng của công thức, axit salvianolic T, avicel, tinh bột và natri cacboxymetyl tinh bột đã được pha trộn theo phương pháp tăng dần đương lượng, một lượng thích hợp etanol khan PVP 5% (w/v) đã được sử dụng để tạo thành vật liệu mềm, hạt được sàng qua rây cỡ 14 mesh

(1,410 mm) và được sấy khô ở 50 - 60°C trong 1 giờ. Magie stearat theo liều lượng của công thức đã được thêm vào để sàng hạt qua rây cỡ 14 mesh.

2. Nén viên

Hạt nhỏ thu được được nén bằng máy ép để tạo thành viên nén.

Ví dụ bào chế 2: Bào chế viên nang axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Công thức bào chế:

Axit salvianolic T, axit (<i>S</i>) - salvianolic T, axit (<i>R</i>) - salvianolic T	100 g
Tinh bột	200 g
Natri cacboxymetyl tinh bột (CMS)	15 g
Etanol khan PVP (Polyvinylpyrrolidon) 5% (w/v)	Lượng phù hợp
Magie stearat	5 g

Công thức trên được bào chế thành 1000 viên nang.

Quy trình sản xuất:

1. Tạo hạt

Axit salvianolic T, (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T và tá dược khác được liệt kê trong công thức được sàng qua rây cỡ 100 mesh (0,149 mm). Theo liều lượng của công thức, axit salvianolic T, tinh bột và natri cacboxymetyl tinh bột đã được pha trộn theo phương pháp tăng dần đương lượng, một lượng thích hợp etanol khan PVP 5% (w/v) đã được sử dụng để tạo thành vật liệu mềm, hạt được sàng qua rây cỡ 14 mesh (1,410 mm) và được sấy khô ở 50 - 60°C trong 1 giờ. Magie stearat theo liều lượng của công thức đã được thêm vào để sàng hạt qua rây cỡ 14 mesh.

2. Đóng gói

Hạt nhỏ thu được được nạp vào viên nang.

Ví dụ bào chế 3: Bào chế thuốc tiêm axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Công thức bào chế:

Axit salvianolic T, axit (<i>S</i>) - salvianolic T, axit (<i>R</i>) - salvianolic T	100 g
Mannitol	100 g
Nước tiêm	Lên đến 2500 ml

Công thức trên được bào chế thành 1000 đơn vị tiêm.

Quy trình sản xuất:

Axit salvianolic T, (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T được lấy theo liều lượng của công thức, được hòa tan với 1000 ml nước tiêm và được khuấy đồng nhất; mannitol được lấy theo liều lượng của công thức, được hòa tan với 500 ml nước tiêm và được bổ sung vào dung dịch nói trên, hỗn hợp được khuấy đồng nhất và được bổ sung vào 0,5 g cacbon hoạt tính và tiếp tục được khuấy ở nhiệt độ không đổi trong 30 phút rồi được lọc, pH của dịch lọc được điều chỉnh về 4,5 - 5,0, được pha loãng với nước tiêm đến 2500 ml, sản phẩm được lọc vô trùng rồi được nạp riêng biệt vào các đơn vị tiêm để thu được sản phẩm.

Ví dụ bào chế 4: Bào chế bột đông khô axit salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T

Công thức bào chế:

Axit salvianolic T, axit (<i>S</i>) - salvianolic T, axit (<i>R</i>) - salvianolic T	100 g
Mannitol	100 g
Nước tiêm	2000 ml

Công thức trên được bào chế thành 1000 đơn vị sản phẩm

Quy trình sản xuất:

Quy trình sản xuất:

Axit salvianolic T, (*S*) - salvianolic T, axit (*R*) - salvianolic T và mannitol được cân theo liều lượng của công thức, rồi được hòa tan với 1500 ml nước tiêm và được khuấy, 0,5 g cacbon hoạt tính được thêm vào rồi hỗn hợp được khuấy trong 20 phút để khử màu, dung dịch được lọc qua màng lọc cỡ micromet (microvoid) (0,45 μm) để loại bỏ cacbon và pha loãng với nước tiêm đến 2000 ml. Dung dịch cuối cùng được lọc vô trùng, được đóng gói riêng và đông khô để thu được sản phẩm.

Ví dụ nghiên cứu về dược lực học1: Hiệu quả của axit (*S*) - Salvianolic T đối với việc phòng bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính do thắt động mạch vành

Nguyên liệu

1. Nguyên liệu và hóa chất

Axit salvianolic T, lô số: 120301, được cung cấp bởi Tasly Holding Group Academy,

Viên nén bao lõi aspirin: quy cách 100 mg/viên, công ty TNHH y tế Bayer, lô số: BJ07160.

Dung dịch nước muối tiêm 0,9% (w/v), Tập đoàn dược phẩm Nanjing Xiaoying, lô số: 2012051205.

Cloral hydrat: AR, công ty TNHH hóa chất Sinopharm, lô số: 20100111.

Red tetrazoline(TTC), công ty TNHH hoá chất Sinopharm, lô số: F20040308.

Bộ thử nghiệm Creatin kinaza (CK), lô số: 20120917; bộ thử nghiệm axit lactic (LD), lô số: 20120919; bộ thử nghiệm malondialdehyt (MDA), lô số: 20120919; bộ thử nghiệm superoxit dismutaza (SOD), lô số: 20120918; bộ thử nghiệm creatin kinaza

isoenzym (CK - MB), lô số: 20120922; Bộ thử nghiệm ATP enzym, lô số: 20120921. Tất cả được cung cấp bởi Viện Kỹ thuật Sinh học Nanjing Jiancheng.

2. Thiết bị chính

Máy thở HX - 300: công ty TNHH khoa học và công nghệ Chengdu Taimeng.

Máy điện tim ECG - 6511: công ty TNHH thiết bị điện tử y tế quang điện Thượng Hải.

Bể nước nhiệt tĩnh màn hình kỹ thuật số HH - 2: công ty TNHH điện gia dụng Guohua.

Cân điện tử kiểu BS 24s: công ty TNHH kỹ nghệ hệ thống thiết bị Startorius Bắc Kinh.

Cân điện tử kiểu BS 110s: thiết bị Startorius Bắc Kinh.

3. Động vật thử nghiệm:

Chuột cống trắng (SD: Sprague Dawley) đực, khối lượng cơ thể 210 - 230 g, được cung cấp bởi công ty TNHH công nghệ động vật phòng thí nghiệm Vital River Bắc Kinh, với chứng chỉ số SCXK (Su) 2009 - 0001.

Phương pháp thử nghiệm và kết quả

1. Thiết kế liều lượng sử dụng

Liều lượng của bột đông khô axit (S) - salvianolic T là 20 mg/kg thể trọng, 10 mg/kg thể trọng. Aspirin: 30 mg/kg thể trọng.

2. Phương pháp thử nghiệm

Chuột cống trắng đực sạch được lấy ra và được xếp nhóm ngẫu nhiên theo thể trọng, bao gồm nhóm dùng thuốc giả (nước cất), nhóm mẫu (nước cất), nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều thấp, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao, và mỗi nhóm gồm 10 chuột. Mỗi nhóm chuột được cho sử dụng qua đường dạ dày hàng ngày, liên tục trong 10 ngày. Liều lượng sử dụng là 1 ml/100 g thể trọng. Sau

khi sử dụng thuốc 1 giờ, chuột được tiêm cloral hydrat liều lượng 300 mg/kg thể trọng bằng cách tiêm trong màng bụng, được gây mê, được cố định, được khử trùng tại các vị trí phẫu thuật bằng iot và rượu, tiếp đó mở ngực ở vị trí xương sườn thứ ba và thứ tư, hô hấp nhân tạo, để lộ tim, thắt nhánh trước trái của động mạch vành bằng cách khâu không gây chấn thương y tế 5/0, đóng khoang ngực nhanh chóng và khử trùng thông thường, thời gian toàn bộ quá trình phẫu thuật không quá 30 giây, hô hấp nhân tạo tiếp tục được duy trì trong 1 - 2 phút sau khi phẫu thuật, penixilin được tiêm trong màng bụng (i. m.) với liều lượng 200.000 đơn vị phòng ngừa nhiễm trùng. Ghi điện tâm đồ (ECG) chuẩn II ở 5 phút trước phẫu thuật, 0 giây, 1 phút, 5 phút, 15 phút, 1 giờ, 4 giờ sau khi thắt, để nghiên cứu các thay đổi của điểm J của ECG.

Lấy tim ra ngay sau khi kết thúc thử nghiệm, rửa sạch máu bằng nước muối sinh lý thông thường, cắt đứt tâm nhĩ và đáy của các mạch máu, cân khối lượng của tâm thất, cắt tâm thất thành 5 phần dọc theo rãnh nhĩ thất và thả các phần vào dung dịch triphenyl tetrazolium clorua (TTC) 1% (w/v), nhuộm trong bể nước ở nhiệt độ không đổi 37°C trong 5 phút, chụp ảnh kỹ thuật số ngay sau khi lấy chúng ra khỏi bể nhuộm, rồi tách các phần không bắt màu (tức là các phần nhồi máu) và cân để tính toán phần trăm bị nhồi máu so với khối lượng tổng số của tâm thất (phần trăm nhồi máu cơ tim), và xử lý t - test (xử lý thống kê) với nhóm mẫu thiếu máu cục bộ. Công thức tính toán phần trăm bị nhồi máu như sau:

$$\text{Phần trăm nhồi máu (\%)} = (\text{khối lượng khu vực nhạt màu} / \text{khối lượng tâm thất}) \times 100\%$$

Sau khi máu được ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 25 phút, huyết thanh được tách ra, xác định thành phần và hoạt tính của creatin kinaza (CK) huyết thanh, lactat dehydrogenaza (LD), creatin kinaza isoenzym (CK - MB), malonaldehit (MDA), superoxit dismutaza (SOD), ATPaza. Kết quả được trình bày trên bảng 5, 6, 7 và Fig.11. (Trong bản gốc không tìm thấy bảng 6, cần kiểm tra lại và điều chỉnh. Nếu không có bảng 6 thì các bảng 7 trở về sau và trích dẫn liên quan cần đẩy lên một thứ tự)

Như được trình bày trên bảng 5, điểm J của ECG của từng nhóm chuột sau khi phẫu thuật thắt động mạch vành cao hơn rõ ràng so với trước khi phẫu thuật ($P < 0,01$), điều đó cho thấy sự thành công của việc khâu thắt mạch vành. So với nhóm mẫu, 5 phút

sau khi phẫu thuật, nhóm dùng axit (*S*) - salvianolic T liều cao ức chế đáng kể sự gia tăng điểm J ($P < 0,05$); 15 phút sau khi phẫu thuật, nhóm dùng axit (*S*) - salvianolic T liều cao ức chế đáng kể sự gia tăng điểm J ($P < 0,05$); 1 giờ và 4 giờ sau khi phẫu thuật, cả nhóm dùng aspirin và nhóm dùng axit (*S*) - salvianolic T liều cao có thể ức chế sự gia tăng điểm J ($P < 0,05$).

Như được trình bày trên bảng 6, tỷ lệ nhồi máu cơ tim của nhóm mẫu và từng nhóm dùng thuốc rõ ràng đều cao hơn so với nhóm dùng thuốc giả ($P < 0,01$), điều đó cho thấy sự thành công của việc khâu thắt mạch vành. So với nhóm mẫu, cả nhóm dùng aspirin và nhóm dùng axit (*S*) - salvianolic T liều cao đều có thể làm giảm đáng kể tỉ lệ nhồi máu cơ tim ($P < 0,05$).

Bảng 5: Hiệu quả của axit (*S*) - salvianolic T đối với sự thay đổi điểm J (mv) của chuột bị nhồi máu cơ tim gây ra bởi thắt động mạch vành ($\bar{X} \pm s$, n=10)

Nhóm	Liều dùng	Trước khi sử dụng	Sau khi sử dụng				
	(mg/kg)		1 giờ	5 giờ	15 giờ	1 giờ	4 giờ
Nhóm mẫu		$\bar{X}$ 0,010 $\pm 0,003$	0,179 $\pm 0,042^{##}$	0,205 $\pm 0,014^{##}$	0,207 $\pm 0,045^{##}$	0,205 $\pm 0,033^{##}$	0,198 $\pm 0,009^{##}$
Nhóm dùng aspirin	30	$\bar{X}$ 0,012 $\pm 0,005$	0,172 $\pm 0,057^{##}$	0,184 $\pm 0,024^{##}$	0,166 $\pm 0,025^{##}$	0,169 $\pm 0,036^{##\Delta}$	0,172 $\pm 0,021^{##\Delta}$
Nhóm dùng axit (<i>S</i>) - salvianolic T liều thấp	5	$\bar{X}$ 0,011 $\pm 0,003$	0,176 $\pm 0,050^{##}$	0,204 $\pm 0,010^{##}$	0,185 $\pm 0,096^{##}$	0,206 $\pm 0,036^{##}$	0,194 $\pm 0,042^{##}$
Nhóm dùng axit (<i>S</i>) - salvianolic T liều cao	10	$\bar{X}$ 0,014 $\pm 0,005$	0,169 $\pm 0,033^{##}$	0,146 $\pm 0,031^{##\Delta}$	0,160 $\pm 0,027^{##\Delta}$	0,170 $\pm 0,014^{##\Delta}$	0,153 $\pm 0,028^{##\Delta}$

P<0,05, ## P<0,01, tiến hành trước - sau khi tự kiểm soát tại từng thời điểm trước và sau khi khâu thắt mạch vành; ▲P<0,05, ▲▲P<0,01, so với nhóm mẫu.

Bảng 6: Hiệu quả của axit (S)-salvianolic T lên chuột bị nhồi máu cơ tim gây ra bởi thắt động mạch vành ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Nhóm	Liều dùng (mg/kg)	Tỉ lệ bị nhồi máu cơ tim (%)
Nhóm dùng thuốc giả		0
Nhóm mẫu đối chứng		35,6±6,21 ^{##}
Nhóm dùng Aspirin	30	24,4±8,5 ^{##▲}
Nhóm dùng axit (S)-salvianolic T liều thấp	5	33,1±7,4 ^{##}
Nhóm dùng axit (S)-salvianolic liều cao	10	25,4±7,4 ^{##▲}

P<0,05, ## P<0,01, so sánh với nhóm dùng thuốc giả ▲P<0,05, được so sánh với nhóm mẫu.

Bảng 7: Hiệu quả của axit (S) - salvianolic T đối với các chỉ số máu của chuột bị nhồi máu cơ tim gây ra bởi thắt động mạch vành

P<0,05, ## P<0,01, so với nhóm dùng thuốc giả; ▲P<0,05, ▲▲P<0,01, so với nhóm mẫu.

Nhóm	Liều dùng	MDA	LD	SOD	CK	CK - MB	Na ⁺ - K ⁺ - ATPaza
	(mg/kg)	(nmol/ml)	(mmol/l)	(U/ml)	(U/ml)	(U/l)	($\mu\text{molPi}/10^7 \text{RBC}/\text{giờ}$)
Nhóm dùng thuốc giả		4,85 ±1,14	1,6 ±0,19	239,4 ±20,7	0,82 ±0,19	745,2 ±121,4	0,006 ±0,001
Nhóm mẫu		9,71 ±2,39 ^{##}	2,07 ±0,31 ^{##}	188,3 ±28,5 ^{##}	1,74 ±0,44 ^{##}	1176,4 ±197,8 ^{##}	0,003 ±0,001 ^{##}

Nhóm dùng aspirin	30	6,84 ±0,97▲	1,75 ±0,17▲	221,1 ±24,7▲	1,01 ±0,16▲▲	841,9 ±20,3▲▲	0,005 ±0,001▲
Nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều thấp	5	7,46 ±1,07▲	1,67 ±0,23▲	220,3 ±32,6	1,18 ±0,29▲	970,9 ±225,1	0,004 ±0,001▲
Nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao	10	6,72 ±1,54▲	1,65 ±0,24▲	241,7 ±19,8▲▲	0,88 ±0,22▲▲	846,7 ±144,2▲▲	0,005 ±0,006▲

Như được minh họa trên bảng 7, mức MDA, LD, CK, CK - MB huyết thanh của nhóm mẫu rõ ràng cao hơn nhóm dùng thuốc giả ($P < 0,01$), trong khi mức SOD, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaza}$ rõ ràng thấp hơn so với nhóm dùng thuốc giả ($P < 0,01$), điều đó cho thấy sự thành công của việc khâu thắt mạch vành. So với nhóm mẫu, thì nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều thấp, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao rõ ràng có thể làm giảm hàm lượng MDA và LD huyết thanh của chuột thiếu máu cục bộ cơ tim ($P < 0,05$); nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao rõ ràng có thể làm tăng hoạt tính SOD huyết thanh của chuột thiếu máu cục bộ cơ tim (tương ứng $P < 0,05$, $P < 0,01$); nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều thấp, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao rõ ràng làm tăng hoạt tính khả năng tồn tại của CK trong huyết thanh của chuột thiếu máu cục bộ cơ tim ($P < 0,05$, $P < 0,01$); nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao rõ ràng có thể làm khả năng tồn tại của CK - MB ($P < 0,01$); nhóm dùng aspirin, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều thấp, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao rõ ràng làm tăng khả năng tồn tại của $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaza}$.

Như được minh họa trên Fig.11, nhóm dùng axit (S) - salvianolic T liều cao và nhóm dùng aspirin có hiệu quả tương đương trong phòng ngừa nhồi máu cơ tim cấp tính gây ra bởi việc thắt động mạch vành. Các thử nghiệm sau đó còn chỉ ra rằng, tương tự như nhóm sử dụng axit (S) - salvianolic T, nhóm sử dụng axit (S) - salvianolic T liều cao và nhóm sử dụng aspirin cũng có hiệu quả tương đương trong phòng ngừa nhồi máu cơ tim cấp tính gây ra bởi việc thắt động mạch vành.

Ví dụ nghiên cứu về dược lực học 2: Hiệu quả bảo vệ của axit (*R*) - Salvianolic T đối với chứng thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính ở chuột thử nghiệm

Nguyên liệu thử nghiệm

Nguyên liệu và hóa chất:

1. Nguyên liệu ban đầu và chất phản ứng: pituitrin (Pit) (một loại hormone tuyến yên) tiêm được cung cấp bởi công ty TNHH dược phẩm Nanjing Xinbai, với số lô 070302. Nước muối sinh lý thông thường được cung cấp bởi công ty TNHH dược phẩm Tianjin Tian'an, với số lô 201009231, đặc điểm kỹ thuật: 500 ml/chai. Axit (*R*) - salvianolic T với độ tinh khiết trên 95% được cung cấp bởi viện nghiên cứu của tập đoàn TASLY HOLDING.

2. Thiết bị chính: Máy ghi sinh lý 8 kênh MedLab được cung cấp bởi Công ty TNHH khoa học và công nghệ Nanjing Medease.

3. Động vật: chuột cống trắng, một nửa là chuột đực và một nửa là chuột cái với khối lượng cơ thể 220 - 250 g, được cung cấp bởi công ty TNHH công nghệ động vật phòng thí nghiệm Vital River Bắc Kinh, với chứng chỉ số SCXK (Jing) 2007 - 0001. Tất cả chuột được nuôi với chế độ ăn đặc biệt (được cung cấp bởi Công ty TNHH Keaoxieli Diet Bắc Kinh) và nước ở vòi trong phòng ăn động vật ở nhiệt độ phòng 20 - 25°C, được chiếu sáng 12 giờ.

Phương pháp thử nghiệm

1. Thiết kế liều lượng sử dụng

Liều lượng sử dụng của bột đông khô axit (*R*) - salvianolic T là 10 mg/kg thể trọng đối với nhóm sử dụng liều cao; 5 mg/kg thể trọng đối với nhóm sử dụng liều thấp.

2. Phân nhóm:

2.1. Sàng lọc động vật: Trước khi thử nghiệm chính thức, chuột được tiêm pituitrin (Pit) (1U/kg) qua tĩnh mạch chủ đuôi. Sau khi tiêm 5 phút, ECG thông thường và ECG

đã được ghi để quan sát sự nâng cao điểm J và sóng T bất thường. Những động vật có ECG bất thường trước khi tiêm hoặc không mẫn cảm với Pit được loại bỏ.

2.2. Phân nhóm động vật: Chuột thử nghiệm mong muốn được chia làm ba nhóm ngẫu nhiên tương ứng là, ① nhóm đối chứng mẫu, ② nhóm dùng bột đông khô axit (R) - salvianolic T liều thấp, và ③ nhóm dùng bột đông khô axit (R) - salvianolic T liều cao.

3. Phương pháp thử nghiệm: chuột cống trắng với khối lượng cơ thể 220 - 250 g, một nửa là chuột đực và một nửa là chuột cái được phân nhóm ngẫu nhiên, mỗi nhóm 10 chuột. Hàng ngày, chuột trong các nhóm điều trị được cho uống dịch huyền phù trong nước của các mẫu, trong khi chuột ở nhóm đối chứng mẫu được cho uống với lượng tương đương nước muối sinh lý thông thường. Tất cả chuột được cho uống như vậy trong 7 ngày. 40 phút sau lần sử dụng cuối cùng, chuột được gây mê và được nối với thiết bị để ghi ECG thông thường chuẩn II. Pituitrin (Pit) được tiêm với tốc độ không đổi theo liều lượng 1 U/kg thể trọng qua tĩnh mạch đuôi trong khoảng 10 giây. Sự thay đổi ECG đã được ghi ở 0 giây, 5 giây, 10 giây, 15 giây, 30 giây, 45 giây, 1 phút, 2 phút, 3 phút, 4 phút, 5 phút, 10 phút và 15 phút sau khi tiêm. Sự khác biệt giữa trước và sau khi tiêm Pit ở mỗi nhóm cũng như sự khác biệt giữa nhóm điều trị và nhóm đối chứng mẫu được so sánh để phân tích sự thay đổi điểm J và sóng T, và dữ liệu được phân tích bằng t - test.

Kết quả thử nghiệm

1. Tác dụng đối với điểm J

Như được trình bày ở kết quả trên bảng 8, khi so với nhóm đối chứng mẫu, mức độ cao của điểm J của ECG của nhóm sử dụng axit (R) - salvianolic T liều cao ít hơn tại 15 giây, 30 giây và 45 giây khi tiêm pituitrin gây ra thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong điều kiện thử nghiệm ($P < 0,05$).

Bảng 8: Sự thay đổi điểm J ở chứng thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính ($\bar{X} \pm s, n=10$)

* : $P < 0,05$, so với nhóm mẫu

Nhóm	Thời điểm
------	-----------

	Thông thường	0 giây	15 giây	30 giây	45 giây	1 phút	5 phút	10 phút
Nhóm mẫu	- 0,060 ±0,033	- 0,039 ±0,037	0,021 ±0,039	- 0,022 ±0,028	- 0,032 ±0,042	- 0,006 ±0,042	- 0,059 ±0,041	- 0,035 ±0,043
Nhóm dùng axit (R) - salvianolic T liều thấp	- 0,054 ±0,046	- 0,040 ±0,027	0,023 ±0,039	- 0,052 ±0,022	- 0,030 ±0,041	- 0,016 ±0,032	- 0,034 ±0,052	- 0,025 ±0,051
Nhóm dùng axit (R) - salvianolic T liều cao	- 0,049 ±0,037	- 0,040 ±0,039	- 0,069 ±0,035*	- 0,058 ±0,035*	- 0,052 ±0,031*	- 0,016 ±0,037	- 0,058 ±0,049	- 0,061 ±0,049

Như được trình bày ở kết quả trên bảng 9, khi so với nhóm đối chứng mẫu, mức độ cao của sóng T của ECG của nhóm sử dụng axit (R) - salvianolic liều cao ở 15 giây và 30 giây là ít hơn, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong điều kiện hiện thử nghiệm ($P < 0,05$).

Bảng 9: Sự thay đổi sóng T ở chứng thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính ($\bar{x} \pm s$, n=10)

* : $P < 0,05$, so với nhóm mẫu

Nhóm	Thời điểm							
	Thông thường	0 giây	15 giây	30 giây	45 giây	1 phút	5 phút	10 phút
Nhóm mẫu	0,098 ±0,039	0,161 ±0,097	0,271 ±0,079	0,131 ±0,089	0,091 ±0,087	0,160 ±0,091	0,135 ±0,097	0,110 ±0,086
Nhóm dùng axit (R) - salvianolic T liều thấp	0,101 ±0,069	0,134 ±0,104	0,211 ±0,109	0,189 ±0,120	0,176 ±0,137	0,151 ±0,097	0,121 ±0,101	0,142 ±0,099
Nhóm dùng axit (R) - salvianolic T liều cao	0,099 ±0,073	0,128 ±0,106	0,150 ±0,101*	0,100 ±0,095*	0,134 ±0,105	0,145 ±0,099	0,127 ±0,104	0,150 ±0,102

Kết luận

So với nhóm kiểm soát chứng mẫu, mức độ cao của điểm J của ECG và sóng T của nhóm sử dụng axit (*R*) - salvianolic liều cao là ít hơn ở 15 giây và 30 giây, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Như thể hiện trong kết quả, theo nghiên cứu này, axit (*R*) - salvianolic T (10,0 mg/kg) có hiệu lực quả đối với bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính chống. Các thử nghiệm sâu hơn cũng chỉ ra rằng, tương tự như axit (*R*) - salvianolic T, axit (*S*) - salvianolic có tác dụng tương tự để chống lại bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính.

Ví dụ nghiên cứu về dược lực học 3: Phản ứng tẩy gốc tự do của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T

Do tác dụng oxy hóa trực tiếp hoặc gián tiếp, gốc tự do tham gia rộng rãi vào quá trình sinh lí và bệnh lí. Khi gốc tự do quá nhiều, chúng luôn luôn tấn công các đại phân tử trong cơ thể bằng sự oxy hóa. Hợp chất axit salvianolic là chất cho nhóm phenolic hydroxyl, có nền tảng cấu trúc cho hoạt động chống oxy hóa của chúng. Trong nghiên cứu này, mô hình phản ứng khử gốc tự do 1,1 - diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH) đã được sử dụng để làm rõ hoạt tính khử gốc tự do của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T.

1. Hoá chất và thiết bị

Axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T với độ tinh khiết trên 95% được cung cấp bởi Tasly Group Academy. Vitamin C và DPPH được mua từ SIGMA. Quang phổ kế tử ngoại (UV - 1800) được mua từ công ty TNHH thiết bị phân tích Rayleigh Bắc Kinh.

2. Phương pháp thử nghiệm

Thể tích phản ứng tổng số là 2 ml. 1 ml dung dịch mẫu với nồng độ khác nhau trong metanol 80% đã được bổ sung vào dung dịch metanol chứa DPPH nồng độ 100 μ M, trộn đồng nhất để cho phép dung dịch phản ứng trong 20 phút ở 25°C, trong bóng tối. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo ở 517 nm. Trong nghiên cứu này, vitamin C được coi như là đối chứng dương. Tốc độ khử gốc tự do được tính toán theo phương trình sau:

$$\text{Tốc độ khử gốc tự do (\%)} = [(1 - A_{\text{mẫu}}/A_{\text{đối chứng}})/A_{\text{đối chứng}}] \times 100\%$$

Trong đó $A_{\text{mẫu}}$ là độ hấp thụ của mẫu được kiểm tra, và $A_{\text{đối chứng}}$ là độ hấp thụ của đối chứng.

3. Kết quả thử nghiệm

Axit (S)/(R) - salvianolic T có khả năng khử gốc tự do cao hơn nhiều so với vitamin C, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa hai đồng phân về khả năng khử gốc tự do ($P < 0,05$).

Bảng 10: Tác dụng khử gốc tự do của axit (S)/(R) - salvianolic T

Mẫu ($\mu\text{g/ml}$)	0,625	1,25	2,5	5	10
axit (S) - salvianolic T	10,32 $\pm$ 0,81	28,77 $\pm$ 2,26	44,22 $\pm$ 1,95	86,01 $\pm$ 8,92	98,97 $\pm$ 5,41
axit (R) - salvianolic T	10,51 $\pm$ 0,73	28,15 $\pm$ 2,47	43,41 $\pm$ 1,85	85,59 $\pm$ 8,75	99,47 $\pm$ 5,14
Vitamin C	8,02 $\pm$ 0,47	15,56 $\pm$ 1,81	21,32 $\pm$ 1,89	56,29 $\pm$ 5,93	79,51 $\pm$ 7,26

Ví dụ nghiên cứu về dược lực học4: Xác định năng lực khử của axit (S)/(R) - salvianolic T

Ở mức độ nhất định, tiềm lực chống oxy hóa được đại diện bởi năng lực khử của thuốc. Nghiên cứu về năng lực khử của axit (S)/(R) - salvianolic T theo sáng chế đã được thực hiện.

1. Hóa chất và thiết bị

Axit (S)/(R) - salvianolic T với độ tinh khiết trên 95% được cung cấp bởi Tasly Group Academy. Kali ferricyanua tinh khiết được mua từ nhà máy hóa chất Tianjin số 1. Axit trichloroacetic tinh khiết được mua từ công ty TNHH hóa chất Sinopharm. Sắt clorua tinh khiết được mua từ công ty TNHH khoa học và công nghệ hóa chất Tianjin Fengchuan. Vitamin C được mua từ SIGMA. Quang phổ kế tử ngoại (UV - 1800) được

mua từ công ty TNHH thiết bị phân tích Rayleigh Bắc Kinh. Máy li tâm lạnh (Z323K) được mua từ HEMMLE, Đức.

2. Phương pháp thử nghiệm

0,5 ml đệm photphat 200 mM (pH 6,8) có chứa nồng độ khác nhau của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T và 0,5 ml dung dịch kali ferrixyanua 1,0% (w/v) được hút và được làm mát trong bể đá sau khi được làm nóng trong bể nước (50°C) trong 20 phút. 0,5 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10% đã được bổ sung và hỗn hợp được ly tâm ở 1000 g/phút trong 10 phút. 1,0 ml dung lớp chất lỏng nổi trên bề mặt đã được lấy ra, rồi thêm vào đó 1,0 ml nước cất và 0,2 ml dung dịch sắt clorua 0,1% (w/v), giữ yên hỗn hợp trong 10 phút và độ hấp thụ được đo ở 700 nm. Trong khi đó, thử nghiệm so sánh đã được thực hiện. Vitamin C hợp chất khử mạnh, đóng vai trò là đối chứng dương trong nghiên cứu này. Năng lực khử của mẫu được đại diện bởi khả năng làm giảm độ hấp thụ của đối chứng so sánh từ độ hấp thụ của mẫu kiểm tra. Điều đó có nghĩa là độ hấp thụ cao hơn thì năng lực khử mạnh hơn.

3. Kết quả thử nghiệm

Năng lực khử của từng axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T đều cao hơn năng lực khử của vitamin C, không có sự khác biệt đáng kể giữa năng lực khử của hai đồng phân axit trên ($P < 0,05$).

Bảng 11: Năng lực khử của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T

Mẫu (µg/ml)	3,125	6,25	12,5	25	50
Axit (<i>S</i>) - salvianolic T	0,157±0,027	0,215±0,011	0,039±0,012	0,771±0,023	1,573±0,036
Axit (<i>R</i>) - salvianolic T	0,152±0,034	0,212±0,009	0,042±0,011	0,761±0,018	1,561±0,026

Ví dụ nghiên cứu về dược lực học⁵: Thử nghiệm chống xơ phổi của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T trên chuột

Xơ phổi là phản ứng và biến chứng phổ biến sau chấn thương phổi, các thay đổi bệnh lý trong đó có viêm lan tỏa phế nang, hình thành foci (tụ điểm) nguyên bào sợi phổi và sửa chữa lặp đi lặp lại và lắng đọng quá mức của chất nền ngoại bào. Xơ phổi thường kết thúc với sự mất mát vĩnh viễn chức năng hô hấp, và thiếu phác đồ phòng và điều trị hiệu quả chứng xơ phổi. Xơ phổi ở chuột gây ra bởi bleomycin là mô hình phổ biến được sử dụng để nghiên cứu xơ phổi ở người, gốc tự do oxy được tạo ra trực tiếp và gián tiếp bởi bleomycin trong mô hình này là một trong những cơ chế kích hoạt xơ phổi.

1. Hóa chất và thiết bị

Axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T với độ tinh khiết trên 95% được cung cấp bởi Tasly Group Academy. Các bộ công cụ (kit) superoxit dismutaza (SOD), catalaza (CAT), peroxidaza (POD), malodiandehit (MDA) được mua từ Viện kỹ thuật sinh học Nanjing Jiangcheng. Bleomycin được mua từ SIGMA.

2. Động vật

Chuột Côn Minh, tất cả là chuột cái với khối lượng cơ thể 22 - 25g, được cung cấp bởi công ty TNHH công nghệ động vật phòng thí nghiệm Vital River Bắc Kinh, và được nuôi trong điều kiện nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối 65% - 75%, và thời gian chiếu sáng 12h:12h.

3. Phương pháp thử nghiệm

Chia 40 con chuột thành 4 nhóm: ① nhóm đối chứng thông thường: được nhỏ mũi bằng nước muối sinh lý thông thường, và được cho uống nước muối sinh lý thông thường; ② nhóm đối chứng mẫu: được nhỏ mũi bằng bleomycin, được cho uống nước muối sinh lý thông thường; ③ nhóm dùng axit (*S*) - salvianolic nhóm T (16mg/kg): được nhỏ mũi bằng bleomycin, được cho uống dung dịch axit (*S*) - salvianolic T; ④ nhóm dùng axit (*R*) - salvianolic T (16mg/kg): được nhỏ mũi bằng bleomycin, được cho uống axit (*R*) - salvianolic T; mỗi nhóm 10 con chuột.

Ở ngày thử nghiệm thứ nhất, chuột được gây mê bằng cloral hydrat, mỗi chuột được nhỏ mũi 50 μg bleomycin để tạo mẫu xơ phổi. Vào ngày thử nghiệm thứ hai, hai nhóm điều trị được cho uống axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T, nhóm và nhóm thông thường

được cho uống với lượng bằng nhau nước muối sinh lí thông thường mỗi lần một ngày trong 3 tuần liên tiếp. Vào ngày thử nghiệm thứ 21, huyết thanh được tách từ máu lấy từ tĩnh mạch ổ mắt để phát hiện TGF - β 1, chuột được giết để lấy phổi, phổi nghiền với nước cất hai lần (tỉ lệ phổi và nước cất 2 lần là 1:5 (w/v)) thành dịch mô đồng nhất, rồi được ly tâm để phát hiện MDA, SOD, CAT, POD trong mô.

Phương pháp thống kê: Kết của được trình bày dưới dạng $x \pm s$, phân tích bằng phân tích phương sai một yếu tố giữa các nhóm sử dụng phần mềm thống kê, so sánh từng đôi được thực hiện với hai nhóm t - test mẫu độc lập.

4. Kết quả thử nghiệm

Tác dụng đối với chứng xơ phổi ở chuột gây ra bởi bleomycin: khi so sánh với chuột bình thường, TGF - β 1 trong phổi của chuột bị xơ phổi gây ra bởi bleomycin tăng 9,96 lần, MDA tăng 1,83 lần, antioxidaza SOD, POA, CAT giảm 1,5 lần, và TGF - β 1 trong huyết thanh cũng tăng 4,44 lần, và mẫu đã được tạo thành công. Cả hai axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T đều có thể ức chế sự gia tăng TGF - β 1 huyết thanh của chuột gây ra bởi bleomycin (bảng 12), ngăn chặn sự suy giảm SOD, POD, CAT trong phổi của chuột gây ra bởi bleomycin (bảng 13).

Bảng 12: Tác dụng của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T đối với hàm lượng các yếu tố trong mô và huyết thanh chuột bị xơ phổi gây ra bởi bleomycin ($x \pm s$, n=10)

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$, so với nhóm mẫu

Nhóm	TGF - β 1 huyết thanh (ng/l)	TGF - β 1 mô (pg/g)	MDA (μ g/g)
Nhóm thông thường	145 $\pm$ 19	129 $\pm$ 17	241 $\pm$ 24
Nhóm mẫu	651 $\pm$ 124	1350 $\pm$ 264	472 $\pm$ 54
nhóm dùng axit (<i>S</i>) - salvianolic T	263 $\pm$ 35**	541 $\pm$ 51**	324 $\pm$ 33**

nhóm dùng axit (<i>R</i>) - salvianolic T	254±29**	562±69**	311±29**
---	----------	----------	----------

Bảng 13: Tác dụng của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T đối với hàm lượng oxidaza trong mô của chuột bị xơ phổi gây ra bởi bleomycin ($\bar{x} \pm s$, n=10)

*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$, so với nhóm mẫu

Nhóm	SOD (U/g)	POD (U/g)	CAT (U/g)
Nhóm thông thường	61,2±6,7	21,3±2,0	27,4±2,4
Nhóm mẫu	33,6±5,2	11,5±1,6	14,9±1,4
nhóm dùng axit (<i>S</i>) - salvianolic T	57,3±4,9*	15,3±2,1**	24,9±2,3**
nhóm dùng axit (<i>R</i>) - salvianolic T	52,2±5,1**	16,4±1,9*	23,1±2,9**

Ví dụ nghiên cứu về được lực học 6: Hiệu quả ức chế của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T đối với nguyên bào sợi gây ra bởi TGF - β

Sự phát triển quá mức của các nguyên bào sợi gây ra bởi TGF - β và sự biệt hóa của nguyên bào sợi hoạt hóa thành nguyên bào xơ cơ đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành chứng xơ phổi, ức chế sự dẫn truyền tín hiệu của TGF - β có thể ngăn chặn sự tăng sinh và hoạt hóa nguyên bào xơ phổi, là một trong những phác đồ quan trọng để phòng và điều trị chứng xơ hóa phổi một cách hiệu quả.

1. Hoá chất và thiết bị

Axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T với độ tinh khiết trên 95% được cung cấp bởi Tasly Group Academy. Môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle), MTT (3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - Diphenyltetrazolium Bromit), TGF - β 1 tái tổ hợp được mua từ Sigma. Penixilin và streptomycin được cung cấp bởi tập đoàn dược phẩm CSPC. Huyết thanh bào thai bò được cung cấp bởi Viện vật liệu kỹ thuật sinh học Hangzhou Sijiqing. Bộ công cụ thử nghiệm collagen được cung cấp bởi công ty Biocolor.

Bộ công cụ xét nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA) laminin (LN) được mua từ viện công nghệ sinh học Beifang Bắc Kinh.

Máy đọc đĩa vi thể kiểu EL - 800X được mua từ công ty BIO - TEK; tủ áp CO₂ được mua từ công ty Thermo; máy phân tích tế bào theo dòng chảy được mua từ công ty FACS.

2. Dòng tế bào

Tế bào L929 được mua từ viện tế bào của Học viện Quân y (Trung Quốc)

3. Phương pháp thử nghiệm

Các tế bào L929 với mật độ 5×10^7 /lít được điều chỉnh bằng dung dịch môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bào thai bò rồi được cấy vào đĩa 96 giếng, được nuôi trong 24 giờ. Bổ sung môi trường chứa cùng nồng độ 2 $\mu\text{g/l}$ TGF - $\beta 1$ và khác nồng độ axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T. Mỗi nhóm gồm 6 giếng, nồng độ cuối cùng của axit (*S*)/(*R*) - salvianolic T là 0, 1, 3, 10, 20, 40, 80 và 150 $\mu\text{mol/l}$. Loại bỏ môi trường sau khi nuôi cấy 72 giờ, phân tích hoạt tính tế bào bằng phương pháp MTT.

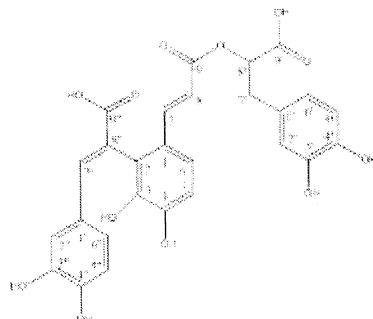
4. Kết quả thử nghiệm

Axit (*S*) - salvianolic T và axit (*R*) - salvianolic T có hiệu quả ức chế sự phát triển của tế bào L929 gây ra bởi TGF - $\beta 1$ (Fig.12), IC₅₀ (nồng độ ức chế 50%) của axit (*S*) - salvianolic T là 26,1 $\mu\text{mol/l}$, IC₅₀ của axit (*R*) - salvianolic T là 26,9 $\mu\text{mol/l}$, không có sự khác biệt đáng kể giữa hai đồng phân.

Kết quả kiểm tra dược lực học theo sáng chế cho thấy rằng, axit salvianolic T theo sáng chế có hoạt tính phòng ngừa chứng nổi máu cơ tim cấp tính và thiếu máu cục bộ cơ tim cấp tính, có khả năng khử và làm giảm gốc tự do xuất sắc, cũng như có hoạt tính tốt trong điều trị bệnh xơ phổi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Axit salvianolic T có công thức (I), muối được dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng (chiral) và solvat của nó:



Công thức (I)

2. Phương pháp điều chế axit salvianolic T theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(1a) chiết xuất dược phẩm đan sâm (*Radix Salviae Miltiorrhizae*) ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và các dược phẩm ở dạng thô khác với nước, cô đặc dịch lọc để thu được sản phẩm chiết trong nước, tiếp đó bổ sung rượu để tiến hành kết tủa và thu được lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, cô đặc lớp chất lỏng nổi trên bề mặt để thu được sản phẩm chiết trong rượu;

(1b) pha loãng sản phẩm chiết trong rượu của bước (1a) với nước, rót hỗn hợp lên nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn, rửa nhựa bằng dung dịch nước axit để loại bỏ tạp chất và tiếp đó rửa giải nhựa bằng etanol để thu được sản phẩm rửa giải trong etanol, cô đặc sản phẩm rửa giải trong etanol để thu được chất chiết;

hoặc, thay thế các bước (1a) và (1b) bằng bước (1) sau:

(1) hòa tan axit salvianolic B trong nước, gia nhiệt cho dung dịch thu được;

(2) điều chỉnh pH của dịch phản ứng thu được ở bước (1) đến pH axit, hoặc tinh chế dịch chiết thu được ở bước (1b) bằng sắc ký lỏng có áp suất cao (HPLC) điều chế, với cột silica gel pha đảo C18, hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic làm chất rửa giải, thu gom sản phẩm rửa giải chứa axit salvianolic T.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm thêm bước:

(3) tách chất đồng phân bất đối xứng từ axit salvianolic T thu được trong bước (2) bằng sắc kí lỏng điều chế, với cột sắc kí là cột bất đối xứng pha đảo, chất rửa giải là hỗn hợp axetonitril - nước - axit formic, thu gom sản phẩm rửa giải chứa axit (S) - salvianolic T và axit (R) - salvianolic T một cách riêng rẽ, đồng khô để thu được sản phẩm tinh khiết của axit (S) - salvianolic T và axit (R) - salvianolic T.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1a), dược phẩm đan sâm ở dạng thô hoặc hỗn hợp của đan sâm và các dược phẩm ở dạng thô khác là những mẫu thuốc sắc, vụn nghiền hoặc bột, dược phẩm ở dạng thô khác thuộc loại này là tam thất (*Radix Notoginseng*) hoặc hoàng kỳ (*Radix Astragali*) hoặc tổ hợp của hai loại này mà tương thích với đan sâm.

5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1a), bước chiết xuất trong nước được thực hiện như sau: sắc dược phẩm ở dạng thô với nước theo tỉ lệ khối lượng nước gấp 4 - 8 lần thể tích dược phẩm ở dạng thô trong 1,5 - 4 giờ; lọc; cô đặc dịch lọc để thu được dịch chiết trong nước với tỉ trọng tương đối là 1,10 - 1,30 (ở 80°C).

6. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1a), dung dịch nước kiềm được sử dụng trong bước chiết xuất bằng nước, dung dịch nước kiềm này ít nhất được chọn từ nhóm bao gồm: dung dịch natri bicacbonat, dung dịch nước natri cacbonat, dung dịch kali hydro cacbonat, dung dịch kali cacbonat, dung dịch nước natri hydroxit, dung dịch nước kali hydroxit.

7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1a), quá trình kết tủa bằng rượu được thực hiện như sau: bổ sung ethanol 95% (thể tích/thể tích) vào dịch chiết trong nước để tiến hành kết tủa cho đến khi nồng độ ethanol đạt 50% - 70% (thể tích/thể tích) (ở 25°C), rồi hỗn hợp được để yên trong 8 - 36 giờ; thu nhận phần lớp chất lỏng nổi trên bề mặt, thu hồi ethanol dưới áp suất thấp, cô đặc để thu nhận dịch chiết trong rượu với tỷ trọng tương đối 1,25 - 1,5 (ở 60°C).

8. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1b), nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là loại nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn không phân cực hoặc phân cực yếu.

9. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1b), tỷ lệ khối lượng của dược phẩm ở dạng thô trong bước 1(a) so với nhựa hấp thụ có lỗ xốp lớn là 5:1 - 1:1.

10. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1b), dung dịch nước axit là ít nhất một dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm: dung dịch nước axit clohydric, dung dịch nước axit sunfuric, dung dịch nước axit nitric và dung dịch nước axit axetic hoặc tổ hợp của chúng; pH của dung dịch được điều chỉnh nằm trong khoảng 1,0 - 5,0; rửa bằng dung dịch nước axit cho đến khi sản phẩm rửa giải là gần như không màu.

11. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1b), etanol 50% - 95% (thể tích/thể tích) được sử dụng để rửa cột 4 - 10 lần, tiếp đó sản phẩm rửa giải được cô đặc để thu được sản phẩm chiết không có mùi rượu.

12. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1), nguyên liệu ban đầu dùng cho phản ứng là axit salvianolic B hoặc muối của nó.

13. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1), tỷ lệ khối lượng của axit salvianolic B và dung dịch nước là 1:0,1 - 1:100000, nhiệt độ phản ứng là 10 - 150°C, thời gian phản ứng là 10 phút đến 24 giờ.

14. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1), dung dịch nước là dung dịch nước axit, dung dịch nước trung tính hoặc dung dịch nước kiềm.

15. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (2), dung dịch bất kì trong số dung dịch nước axit clohydric, dung dịch nước axit sunfuric, dung dịch nước axit nitric và dung dịch nước axit axetic hoặc tổ hợp của chúng đều có thể được sử dụng để điều chỉnh độ pH của dung dịch phản ứng về 1,0 - 6,0.

16. Phương pháp điều chế theo điểm 2, trong đó ở bước (2), sắc ký lỏng có áp suất cao (high pressure liquid chromatograph-HPLC:) có thể là HPLC trục động (dynamic axial HPLC), cột sắc ký là cột silica gel pha đảo C18, hòa tan dịch phản ứng đã được điều chỉnh pH trong bước 1 hoặc dịch chiết thu được ở bước 1(b) với pha di động, pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỉ lệ thể tích 10:90:1 - 90:10:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient; tốc độ dòng là 300 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; HPLC được sử

dụng để giám sát quá trình rửa giải, thu gom phân đoạn trong khoảng thời gian lưu giữ 21,2 - 24,0 phút, cô đặc để sấy khô, thu được axit salvianolic T.

17. Phương pháp theo điểm 3, trong đó ở bước (3), sắc kí lỏng điều chế được sử dụng để thực hiện tách chất đồng phân bất đối xứng, cột sắc kí là cột pha đảo, hòa tan axit salvianolic T thu được ở bước (2) với pha di động, pha di động là axetonitril:nước:axit formic với tỷ lệ thể tích là 10:90:1 - 90:10:1; dung môi rửa giải sử dụng tỉ lệ của pha di động nói trên, phương pháp rửa giải là rửa giải đẳng dung môi hoặc rửa giải gradient; tốc độ dòng là 25 ml/phút; bước sóng phát hiện là 280 nm; HPLC được sử dụng để giám sát quá trình rửa giải, thu gom một cách riêng biệt phân đoạn axit (*S*) - salvianolic T ở thời gian lưu giữ 19,5-21,1 phút, axit (*R*) - salvianolic T ở thời gian lưu giữ 23,9-25,3 phút, đông khô sau khi cô đặc ở nhiệt độ thấp, thu nhận sản phẩm axit (*S*) - salvianolic T tinh khiết và axit (*R*) - salvianolic T tinh khiết.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó nhiệt độ thấp là nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 40°C.

19. Dược phẩm chứa axit salvianolic T, muối dược dụng của nó, chất đồng phân bất đối xứng và solvat của nó theo điểm 1.

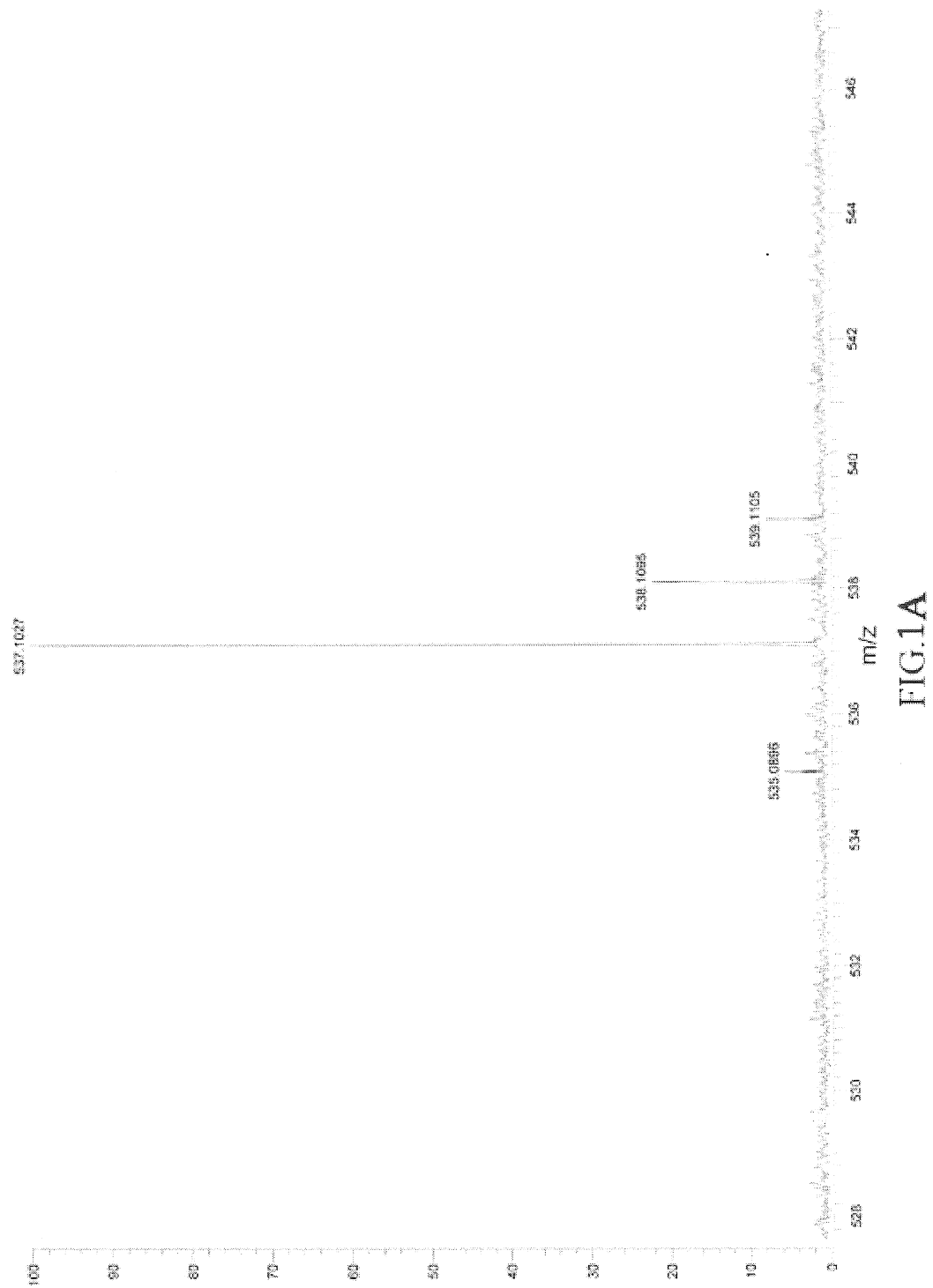


FIG.1A

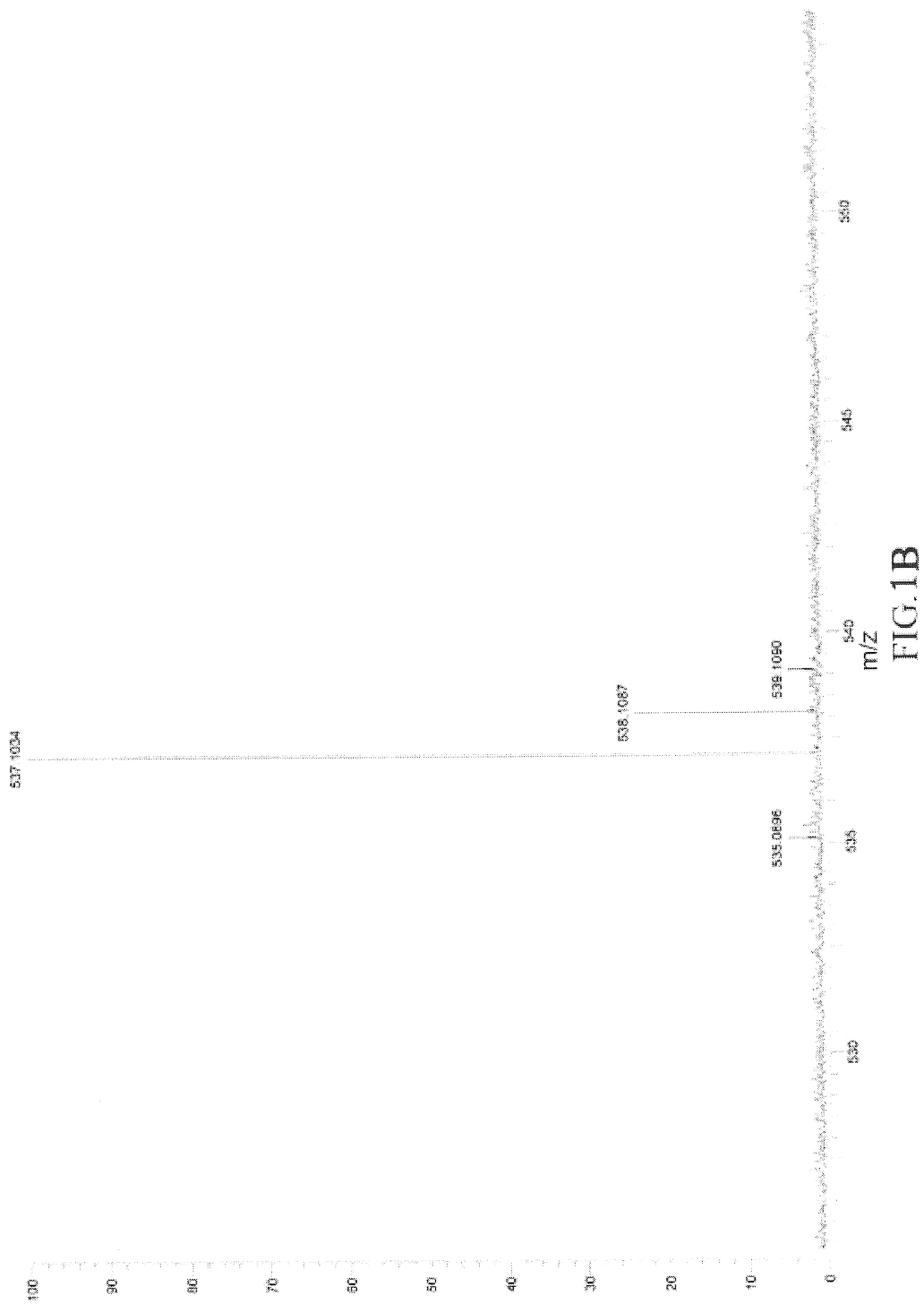


FIG.1B

M 1H-NMR DMSO-D6 303K AV-500

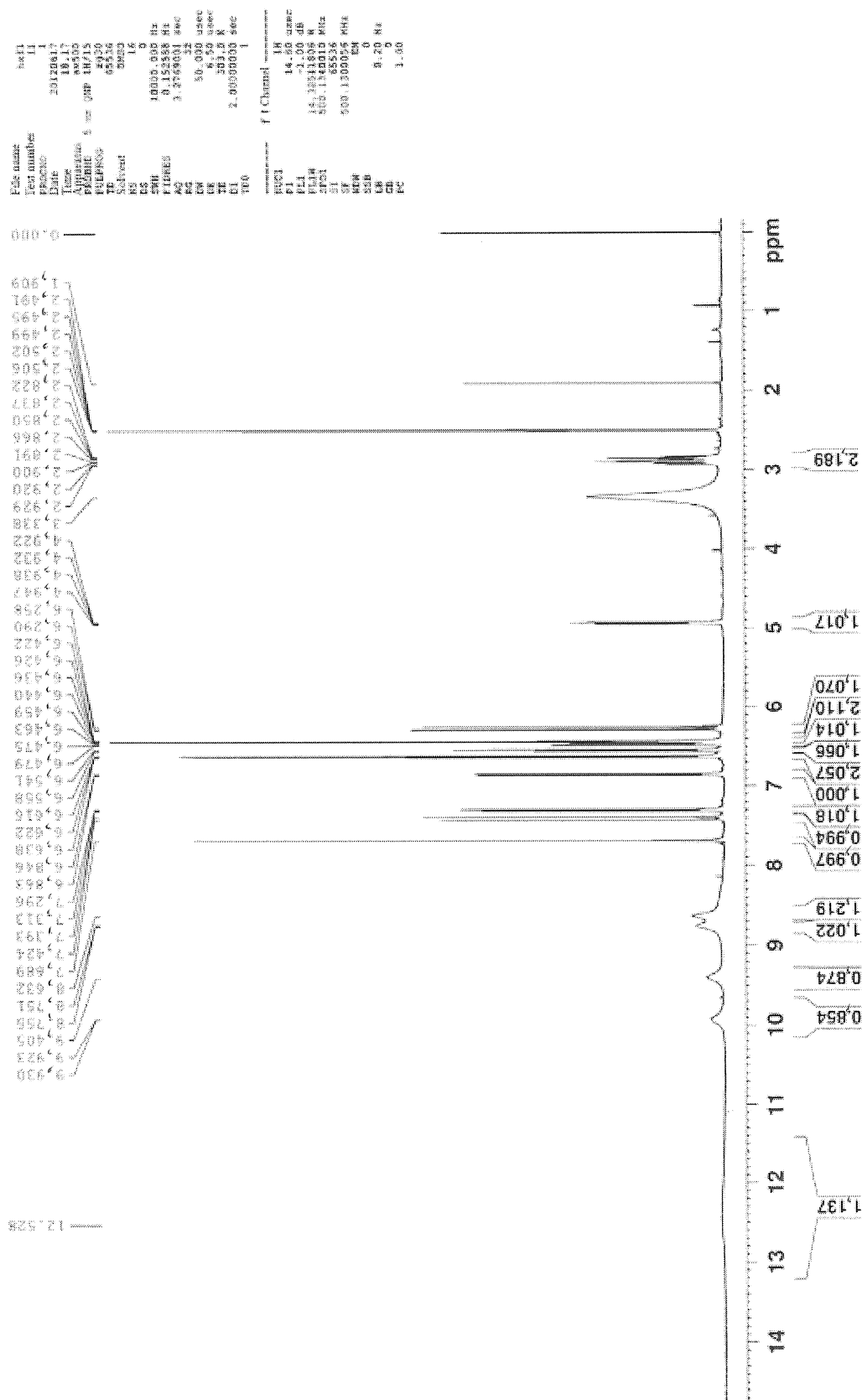


FIG.2A

L 1H-NMR DMSO-D6 303K AV-500

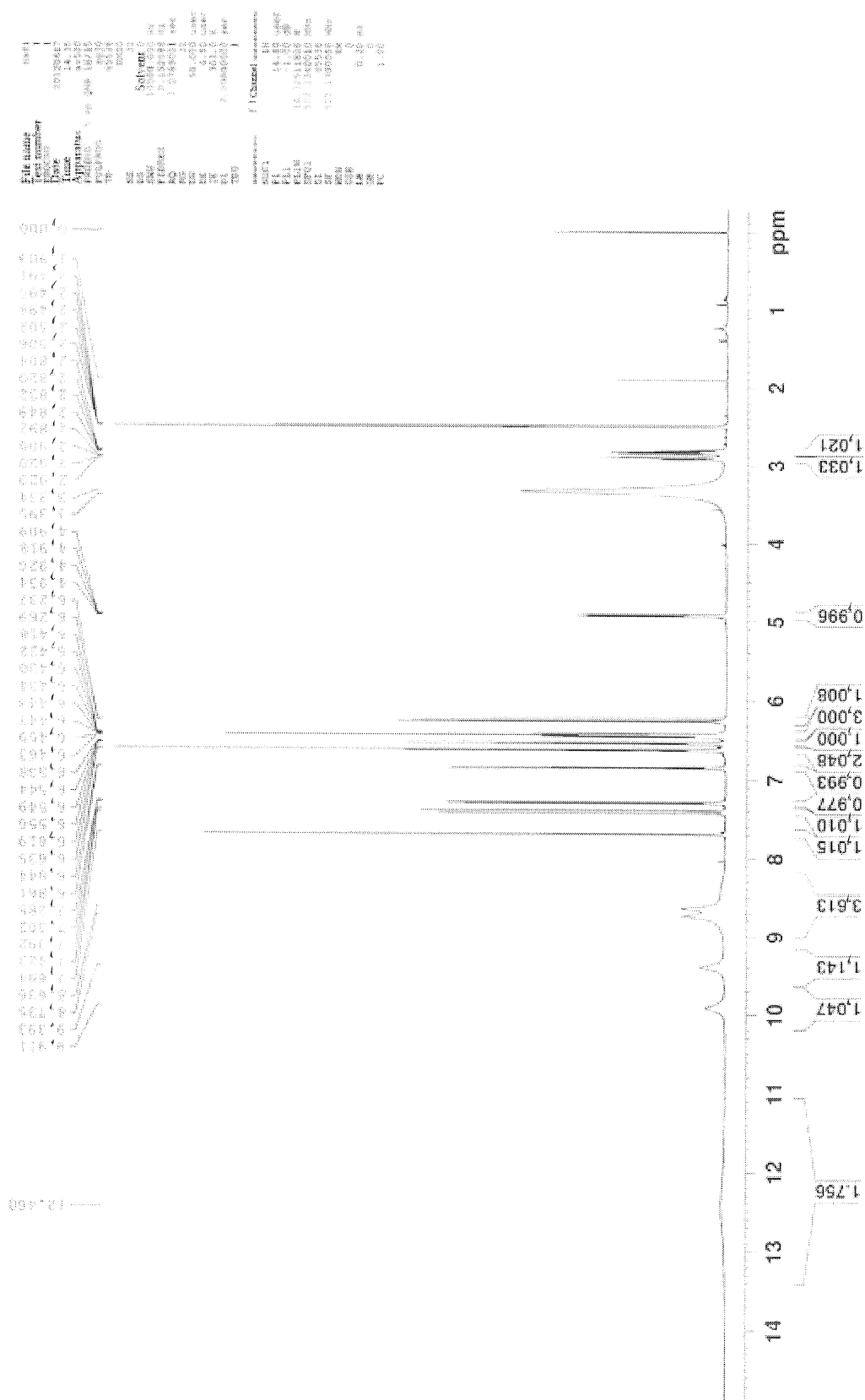
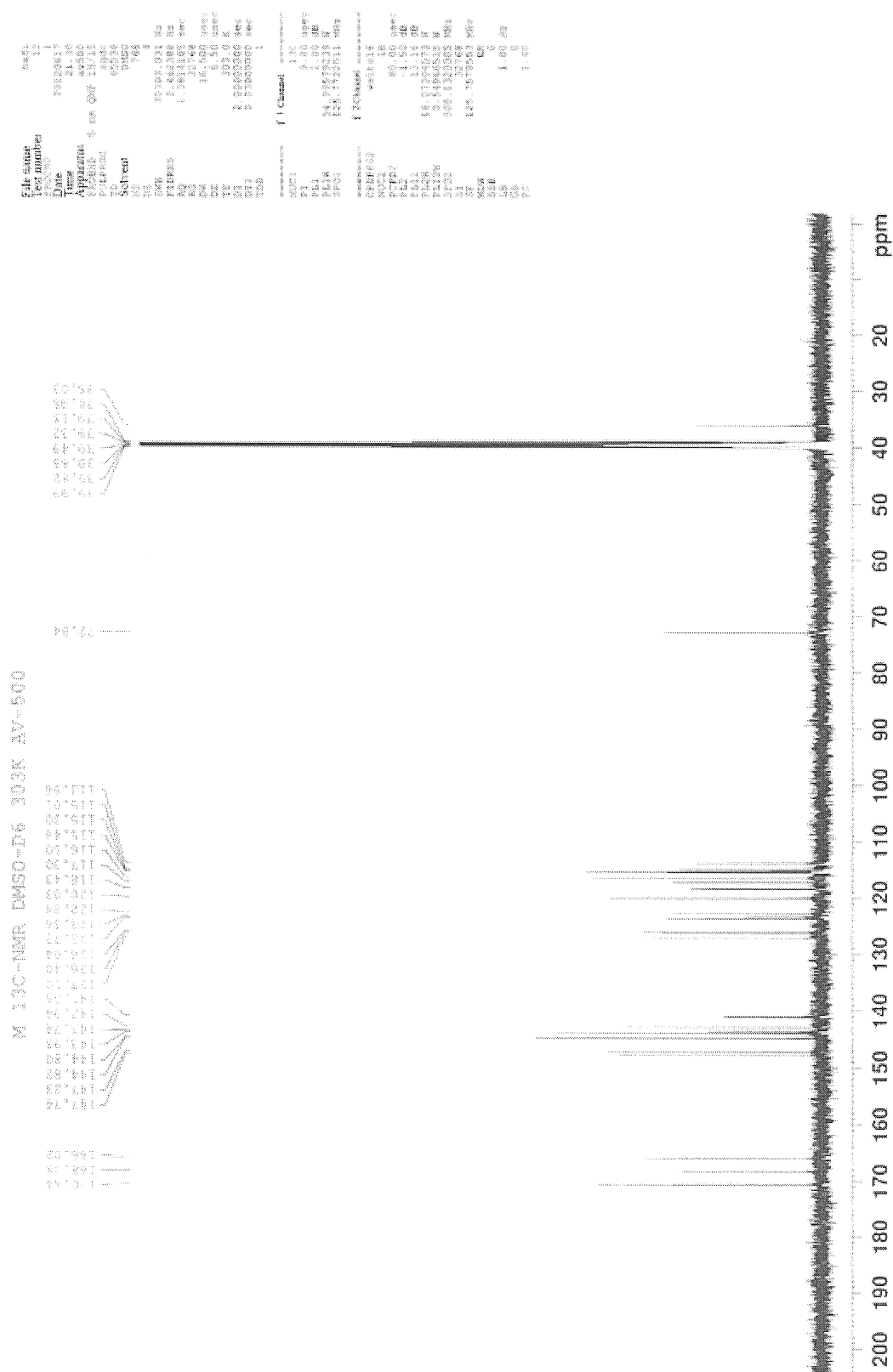
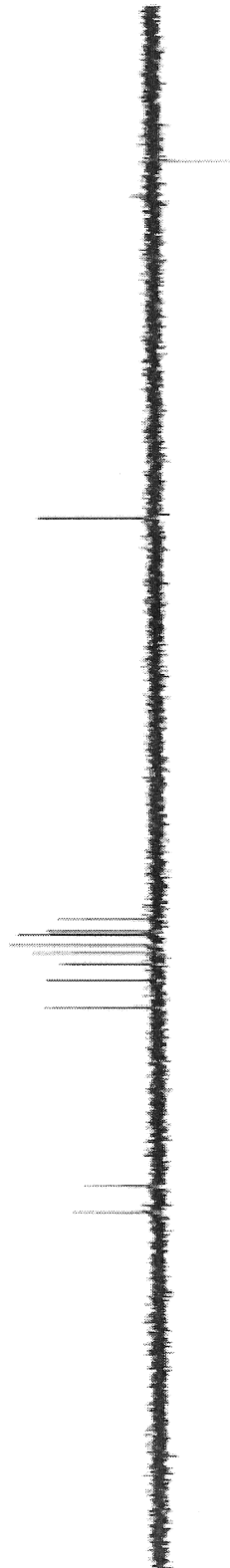


FIG.2B

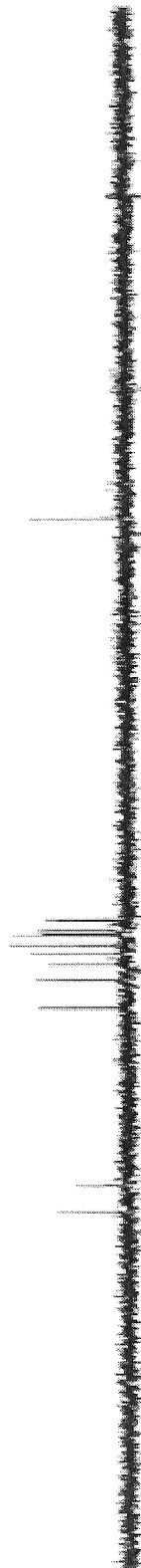




DEPT-135



DEPT-90



M 13C-NMR DMSO-D6 303K AV-500

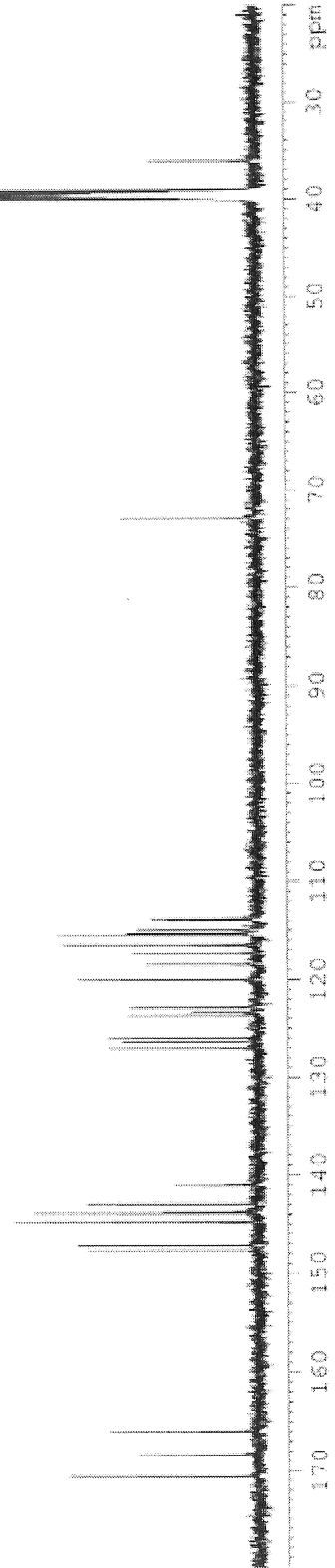
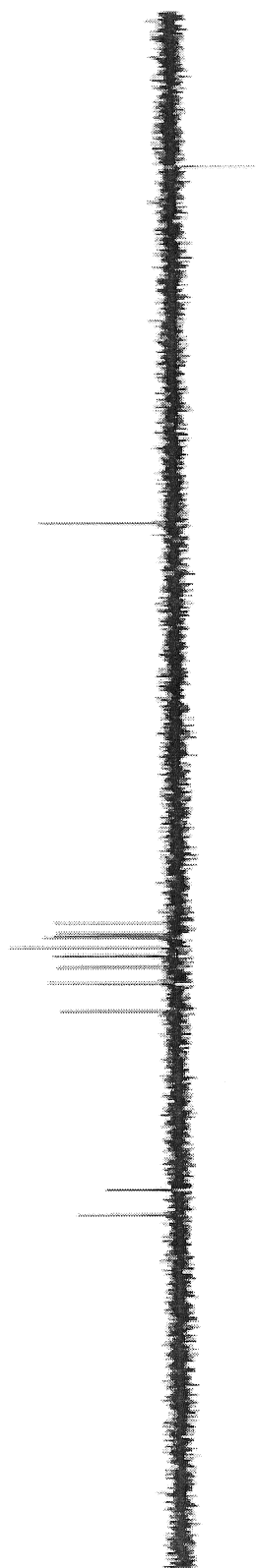
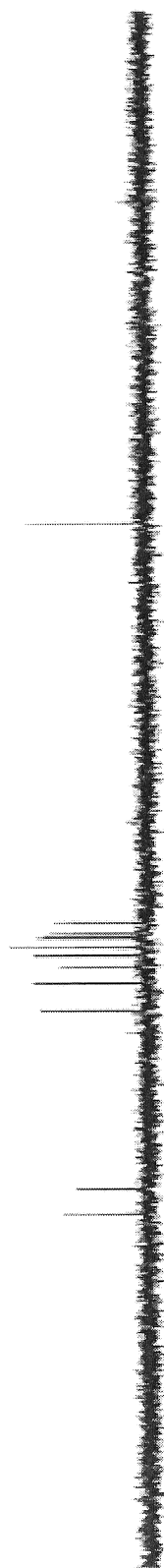


FIG.4A

DEPT-135



DEPT-90



L 13C-NMR DMSO-D6 303K AV-500

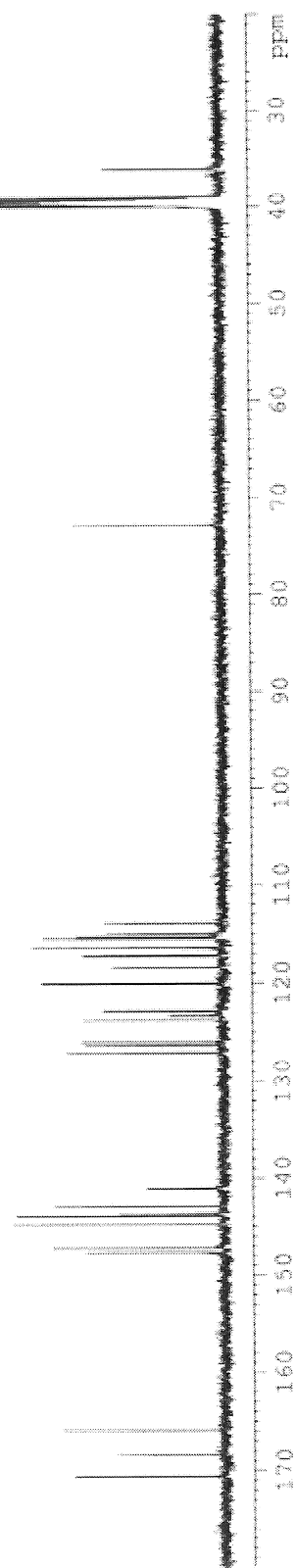


FIG.4B

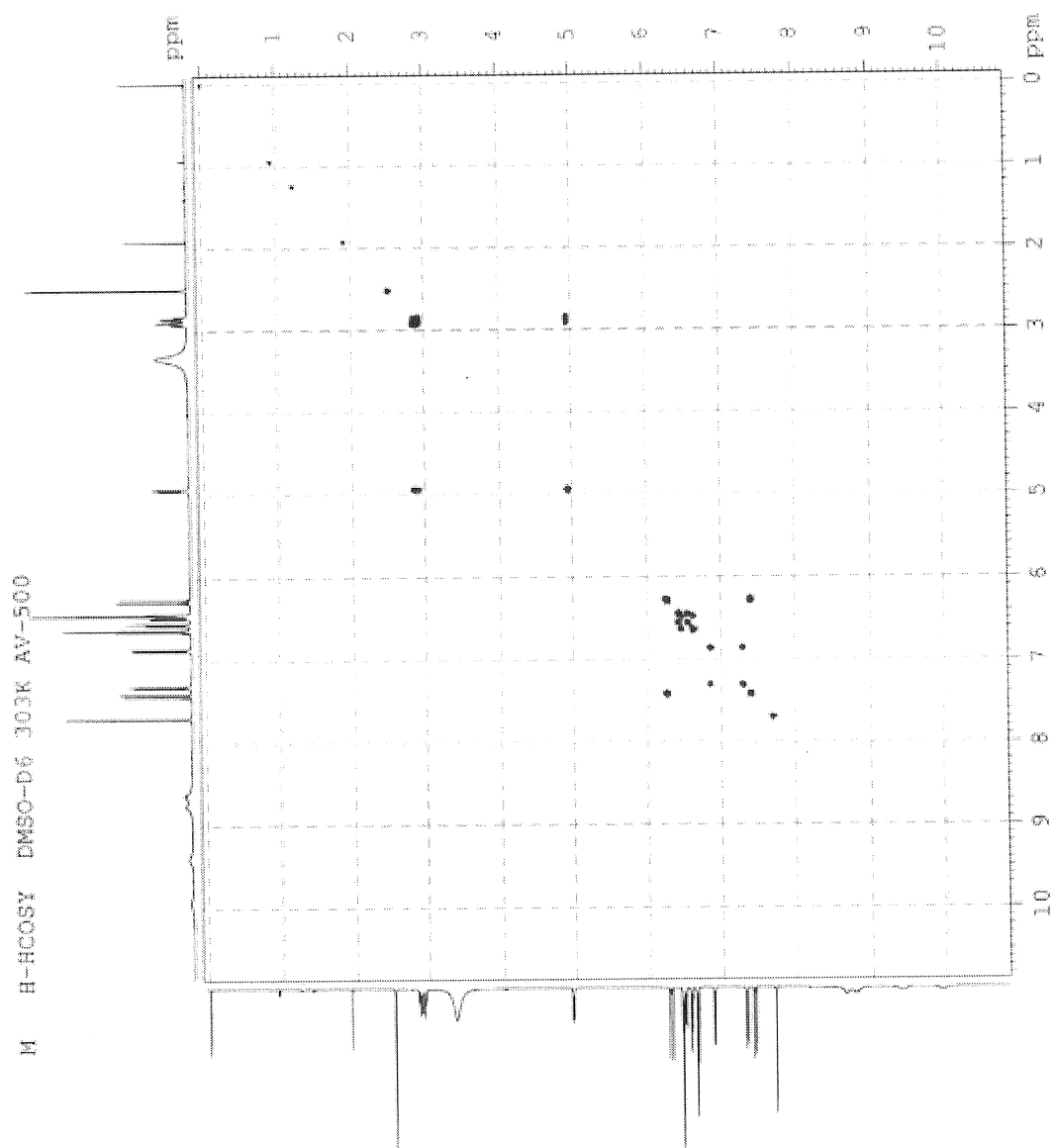


FIG.5A

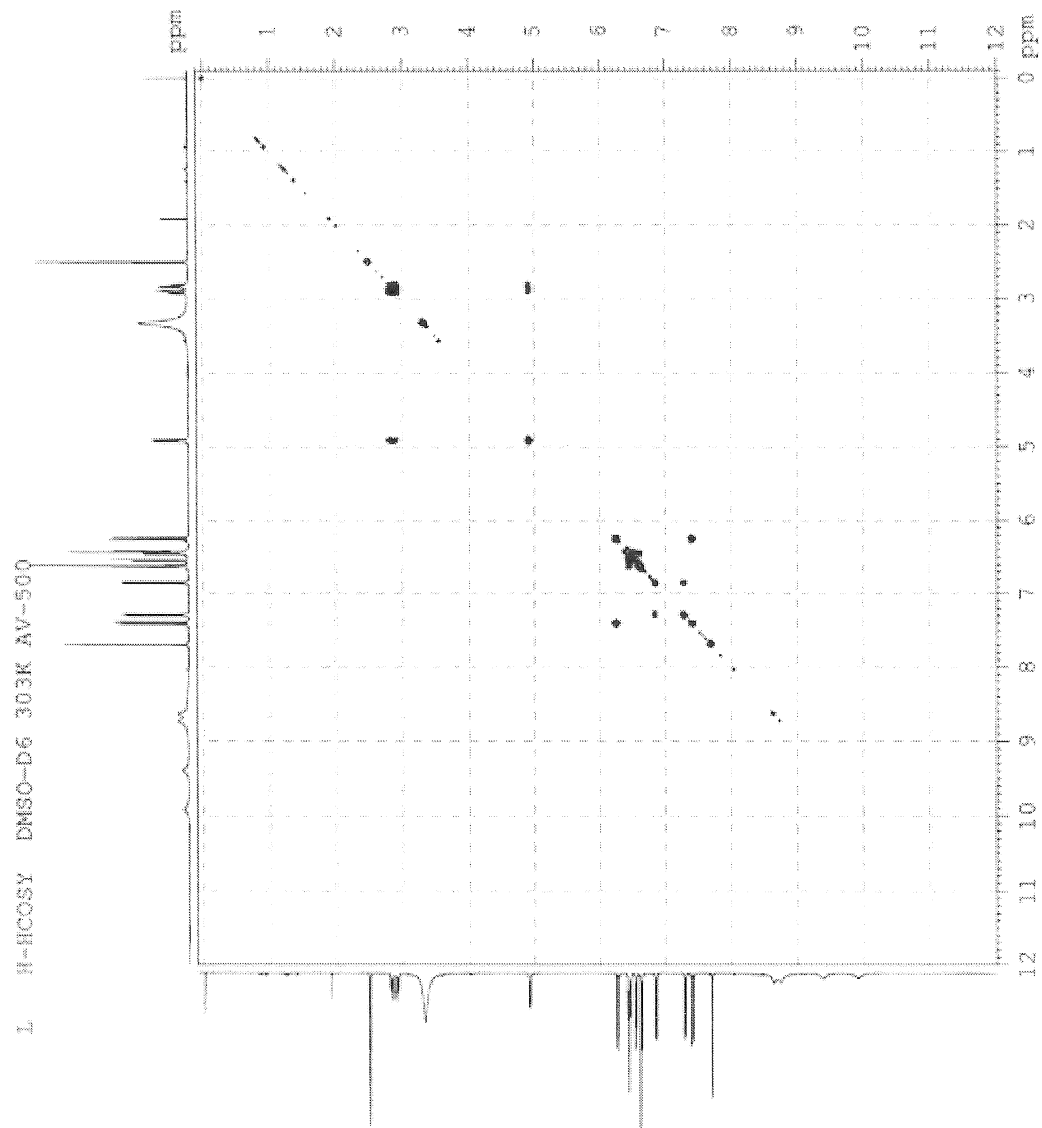


FIG.5B

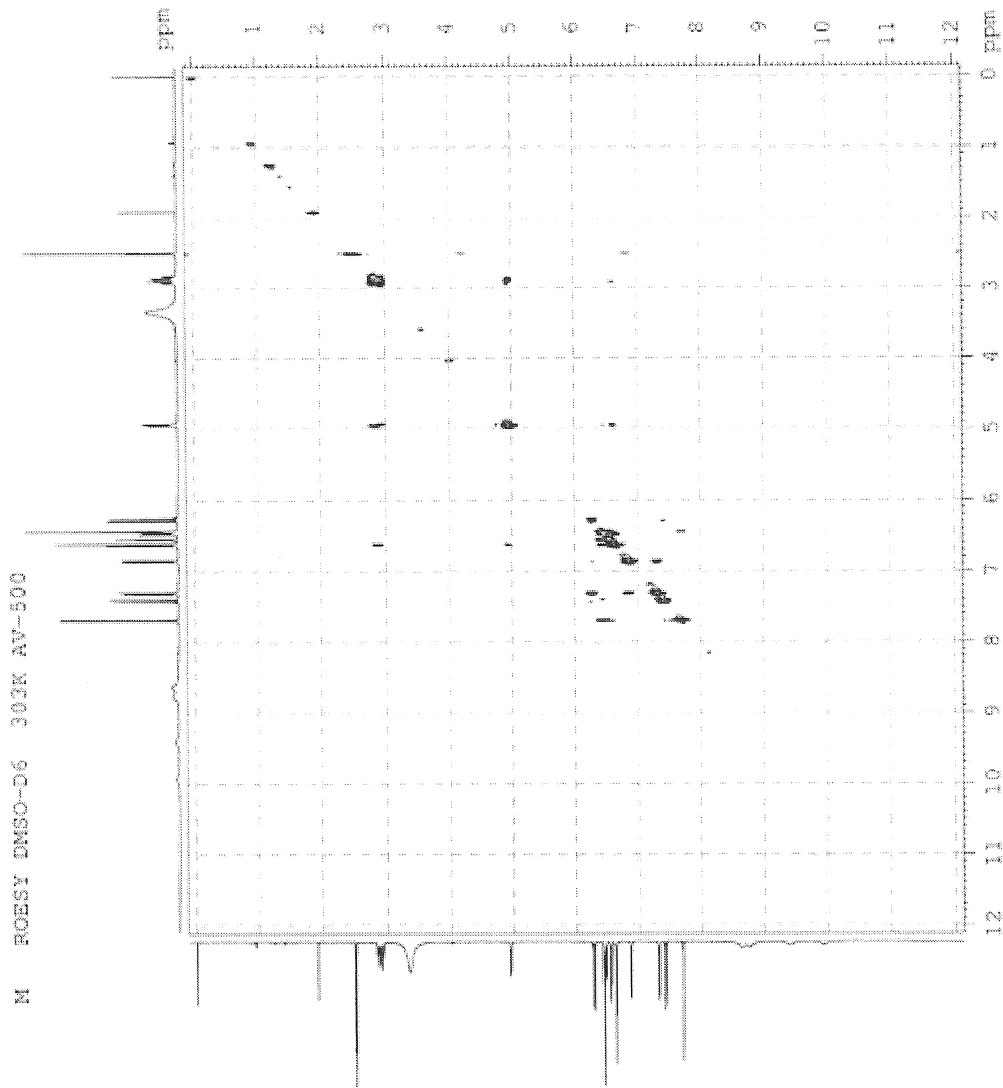


FIG.6A

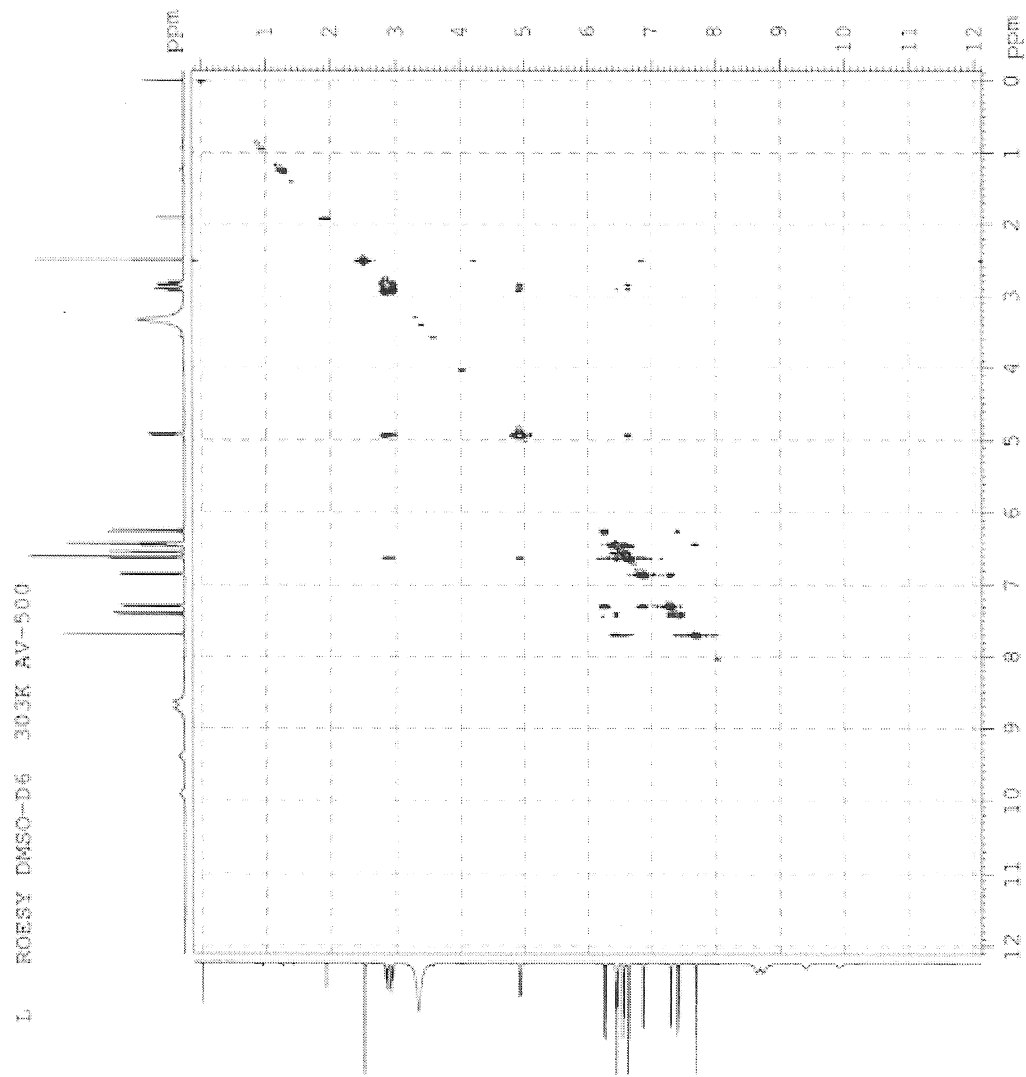


FIG.6B

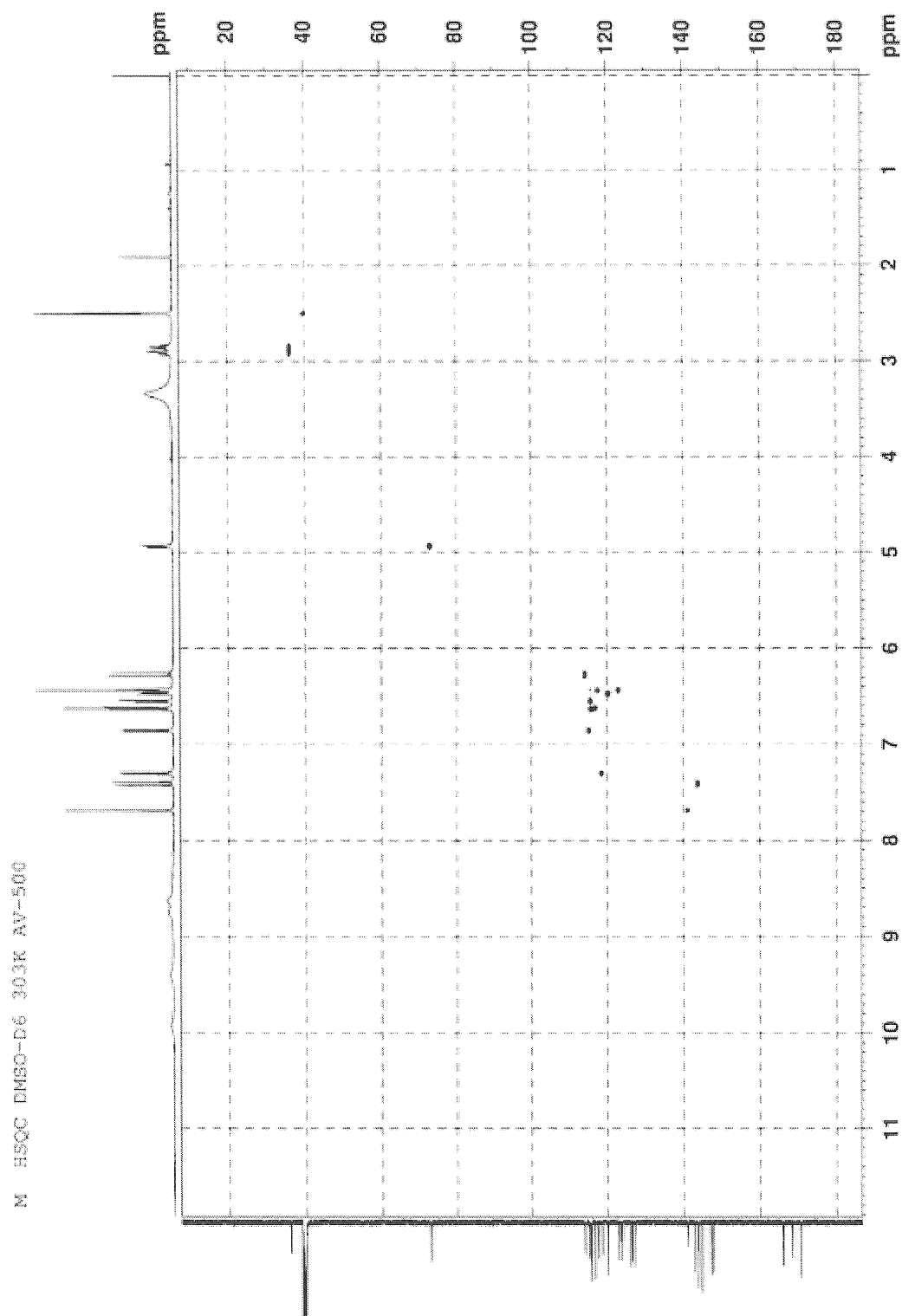


FIG.7A

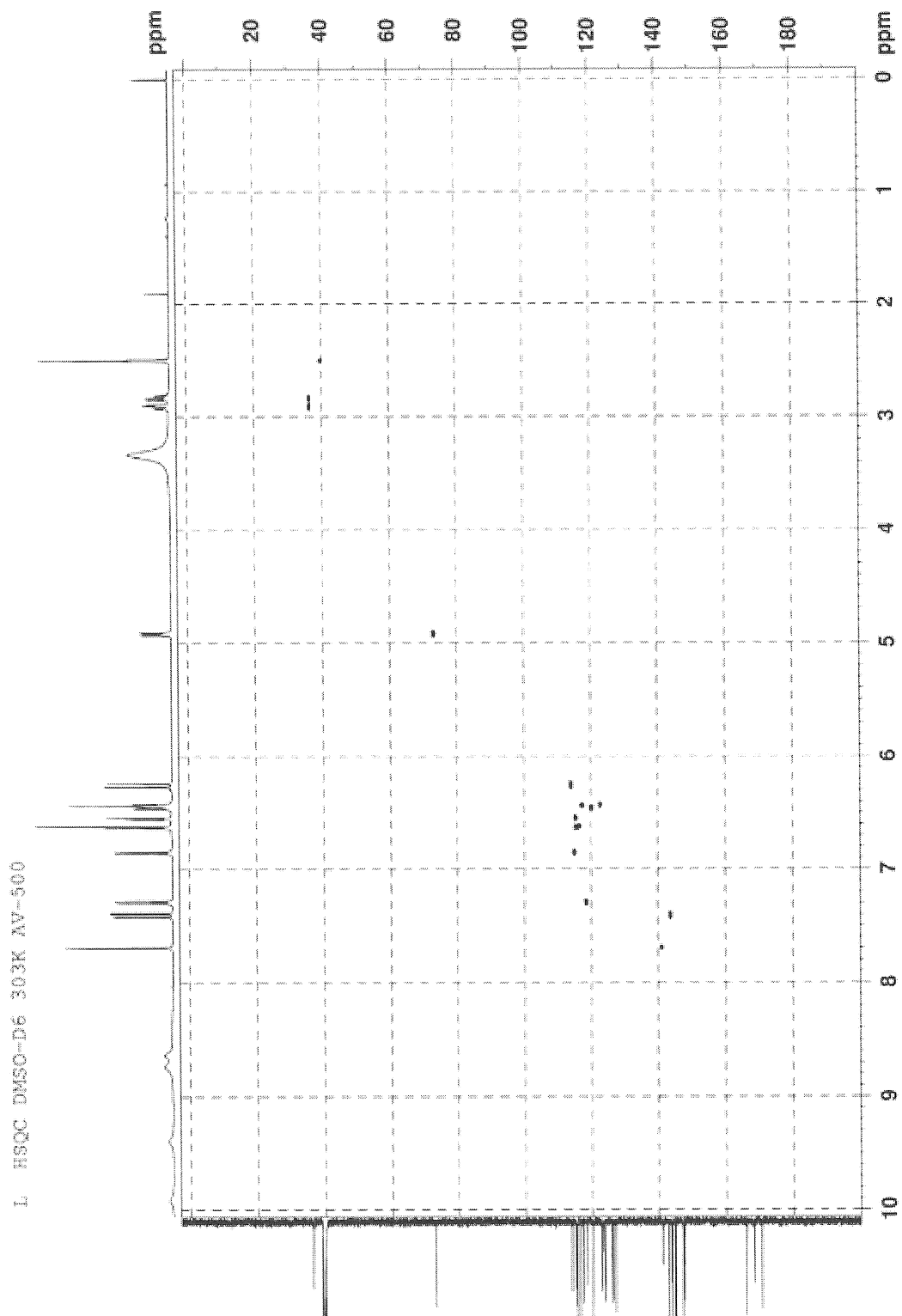


FIG.7B

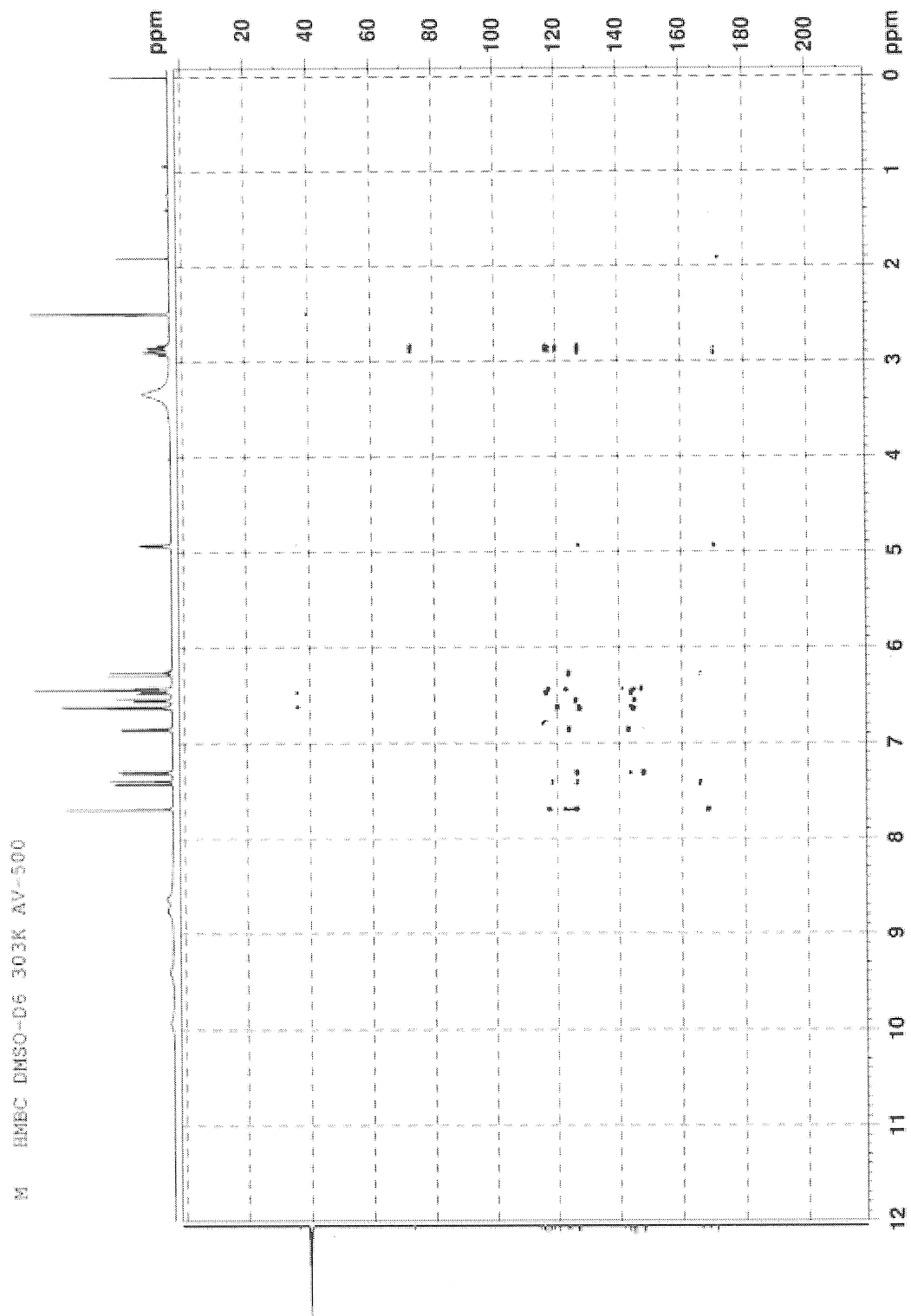


FIG. 8A

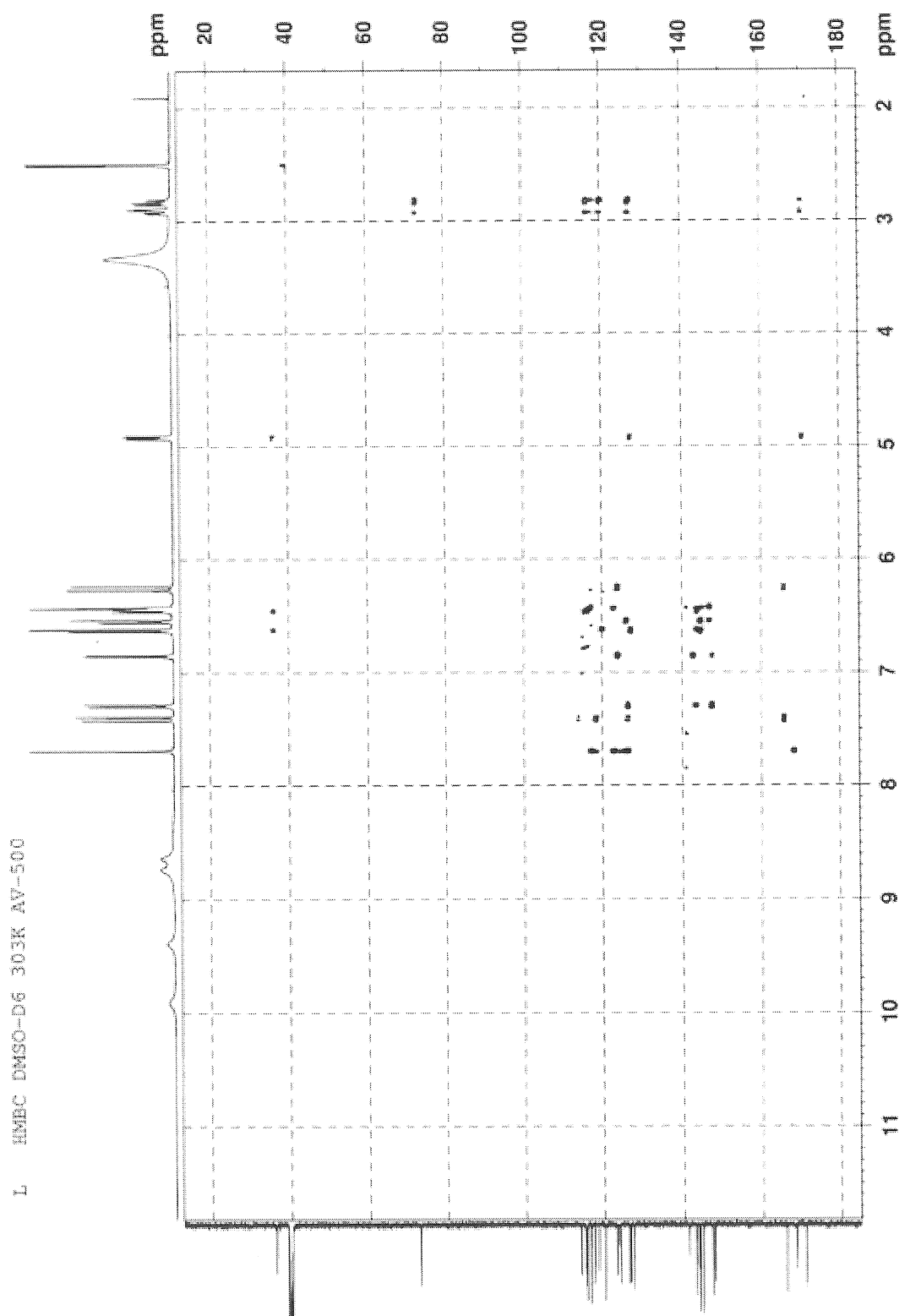


FIG.8B

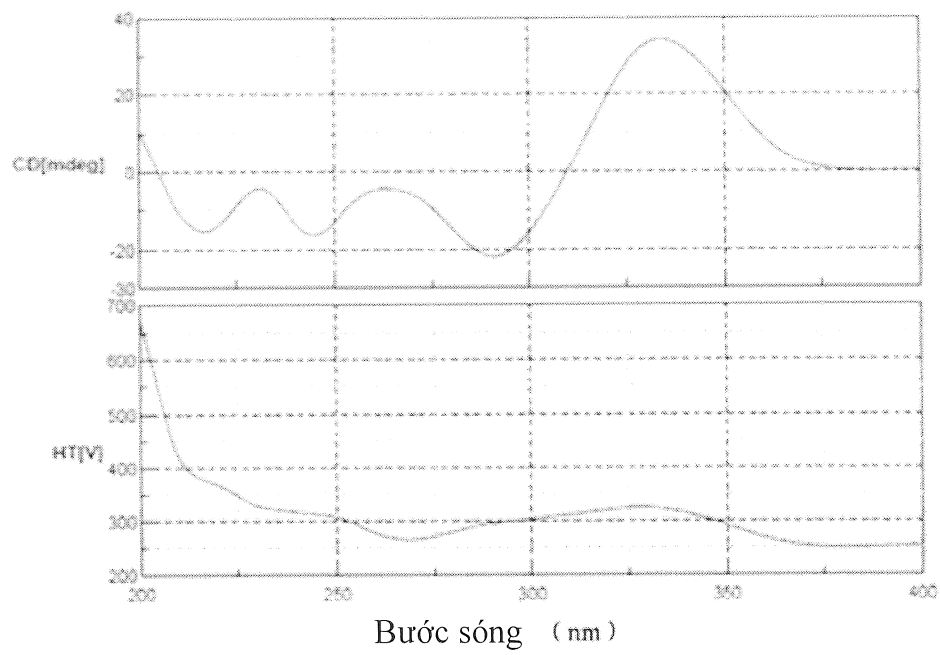


FIG. 9A

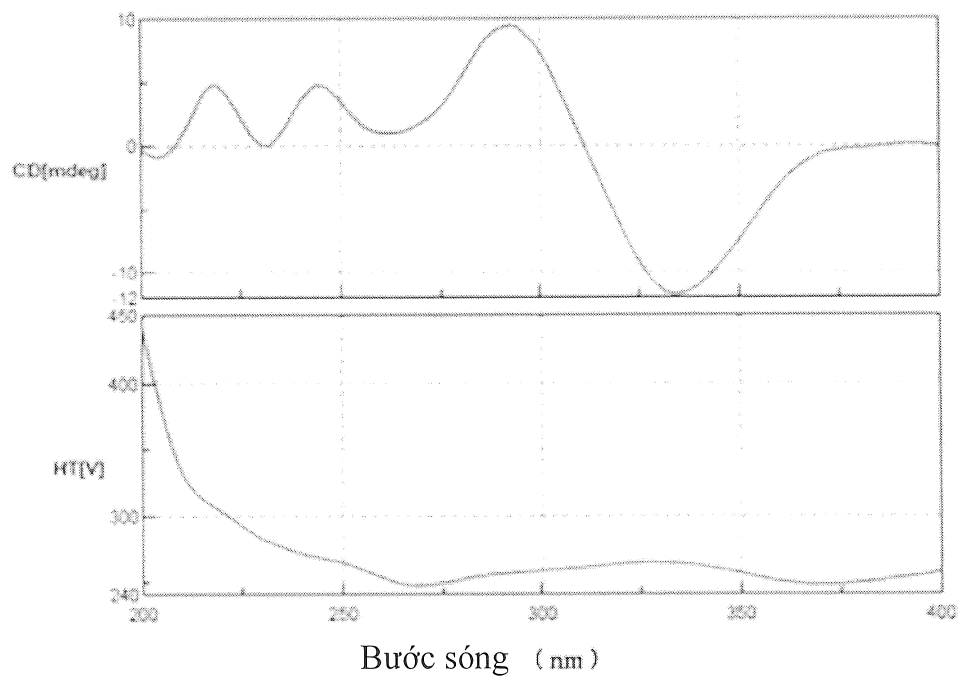


FIG. 9B

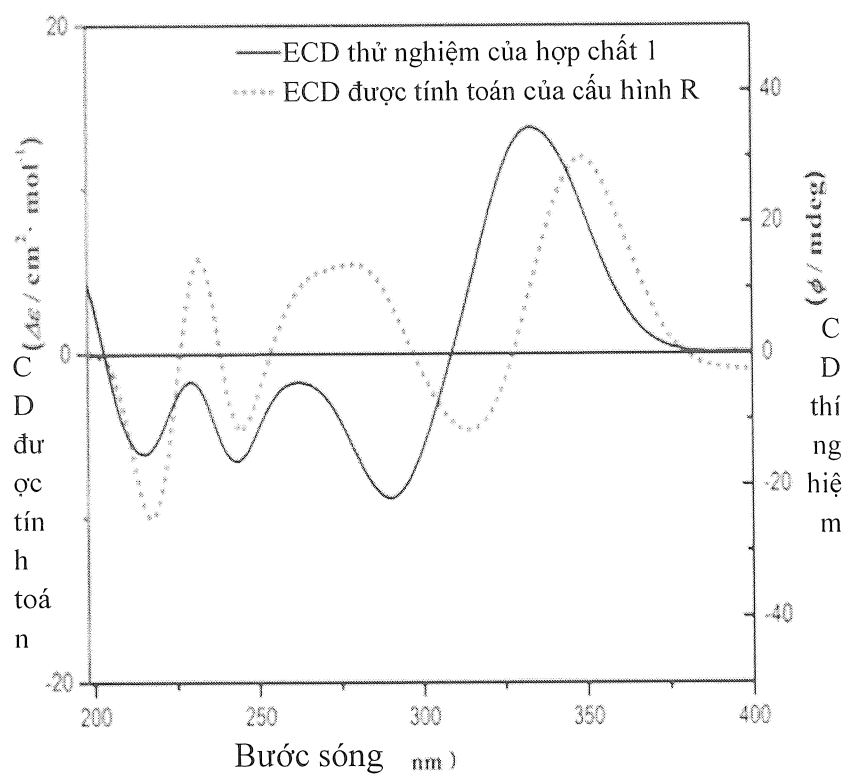


FIG.10A

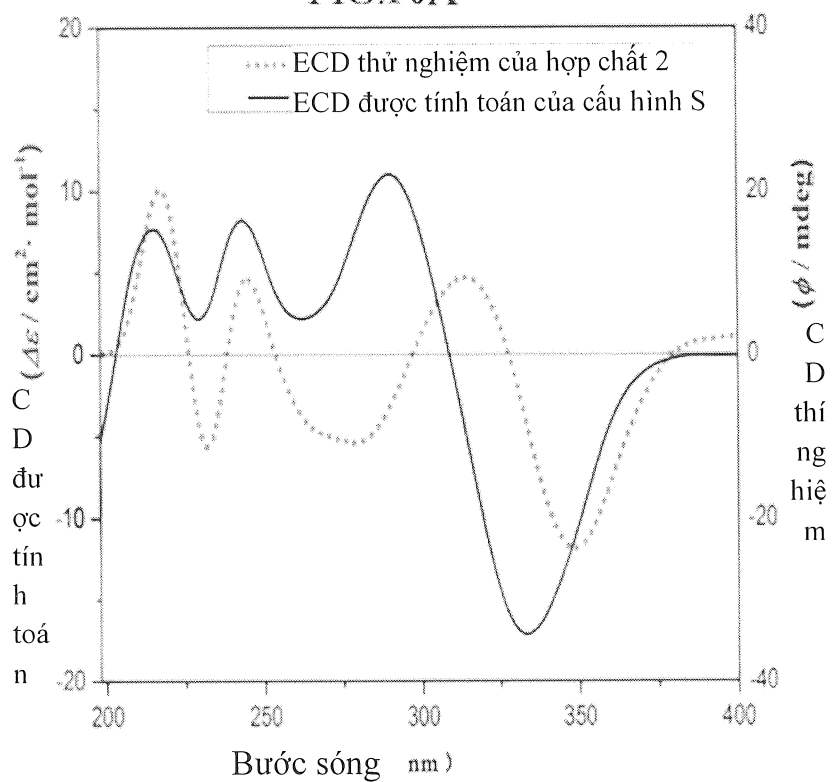
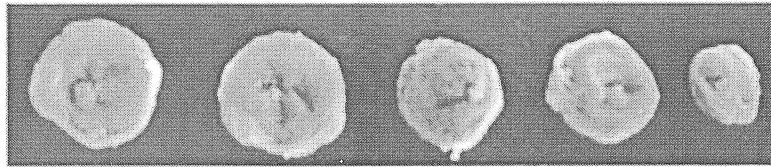
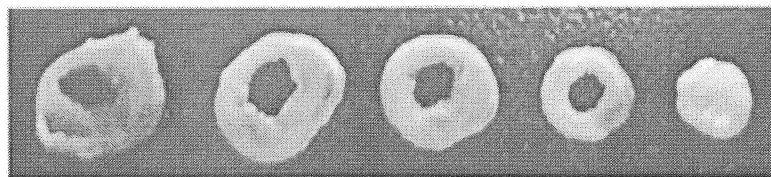


FIG.10B

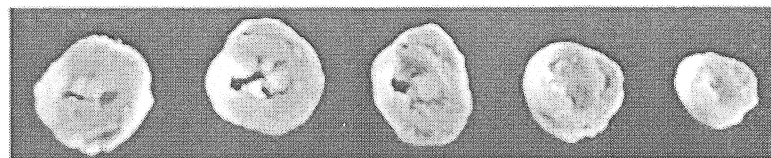
Nhóm dùng thuốc giả



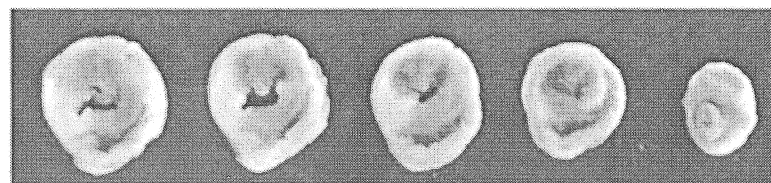
Nhóm mẫu



Nhóm dùng aspirin



Nhóm dùng axit (*S*)-salvianolic T liều cao



Nhóm dùng axit (*S*)-salvianolic T liều thấp

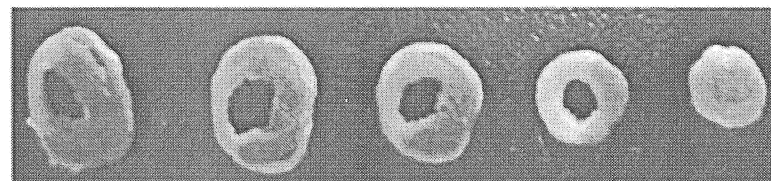


FIG.11

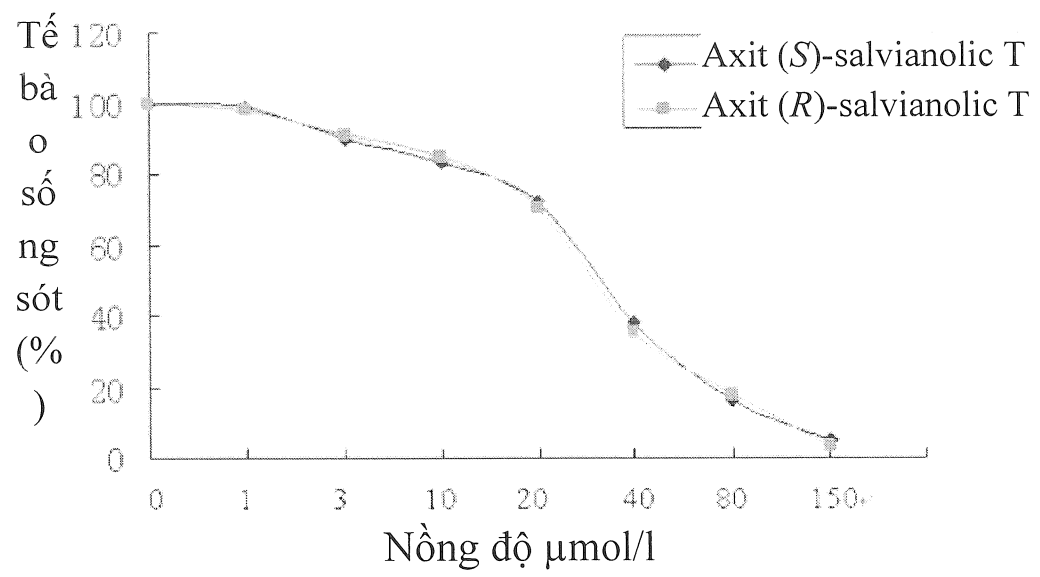


FIG.12